

## 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1059

产品规格：50管/48样

### 产品说明：

PDH（EC 4.1.1.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是丙酮酸脱氢酶复合体(PDHC)催化丙酮酸氧化脱羧的限速酶，催化丙酮酸脱羧生成羟乙基-TPP，把糖酵解和三羧酸循环连接起来。PDH催化丙酮酸脱氢，同时还原2,6-二氯酚靛酚（2,6-DCPIP），从而导致605nm光吸收的减少。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

### 产品内容：

| 试剂名称 | 规格         | 保存条件 |
|------|------------|------|
| 试剂一  | 液体60mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂二  | 液体0.6mL×1支 | -20℃ |
| 试剂三  | 液体15mL×2瓶  | 2-8℃ |
| 试剂四  | 液体25mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂五  | 粉剂×2支      | -20℃ |
| 试剂六  | 液体2mL×1瓶   | 2-8℃ |
| 试剂七  | 液体8mL×1瓶   | 2-8℃ |

### 溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存。
2. 工作液的配制：临用前把11.5mL试剂四、一支试剂五、0.9mL试剂六、3.5mL试剂七转移到一瓶试剂三中混合溶解待用（共30.9mL，34T）；用不完的试剂-20℃分装保存，可以保存4周。避免反复冻融。

### 所需的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：称取约0.1g组织，加入1mL试剂一和10μL试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 11000g离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 细胞或者细菌样本：先收集500万细胞到离心管内，离心后弃上清；之后加入1mL试剂一和10μL试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率20%或200W，超声3s，间隔7s，总时间5min）；然后11000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清(浆)及其它液体样本：直接检测。若溶液有浑浊则离心后去上清进行测定。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至605nm，蒸馏水调零。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

2. 每个样本需要900 $\mu$ L工作液，按实验所需取出一定量工作液于37 $^{\circ}$ C(哺乳动物)或25 $^{\circ}$ C(其他物种)水浴锅中水浴10min。
3. 空白管：在1mL比色皿中加入900 $\mu$ L工作液和50 $\mu$ L水，混匀，立即记录605nm处10s处吸光值A1和1min10s后的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{\text{空白}}=A1-A2$ 。空白管只需测1-2次。
4. 测定管：在1mL比色皿中加入900 $\mu$ L工作液和50 $\mu$ L样本，混匀，立即记录605nm处10s处吸光值A3和1min10s后的吸光值A4，计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A3-A4$ 。

### 三、PDH活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 904.762 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/g 质量)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.828 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

4. 按样本体积计算

单位的定义：每mL液体每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 904.762 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应体系总体积，9.5 $\times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1 $\times 10^4$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.05mL；V样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

### 注意事项：

1. 测定过程中所有样本在冰上放置并于2小时内检测，以免变性和失活。
2. 测定管的 $\Delta A$ 值在0.01-0.25之间，若测定管的 $\Delta A$ 值大于0.25，需将样本进行稀释。计算公式中乘以稀释倍数。若测定管的 $\Delta A$ 值小于0.01，需加大样本量后重新测定，注意同步修改计算公式。
3. 由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去本身的蛋白含量。

### 实验案例：

1. 取0.1g肺脏加入1mL试剂一和10 $\mu$ L试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 $^{\circ}$ C 11000g离心10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A3-A4=1.226-1.015=0.211$ ， $\Delta A_{\text{空白}}=A1-A2=1.442-1.439=0.003$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PDH活性 (U/g 质量)} = 913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 1900.72 \text{ U/g 质量}$$

2. 取0.1g稗草加入1mL试剂一和10 $\mu$ L试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 $^{\circ}$ C 11000g离心10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A3-A4=1.391-1.379=0.012$ ， $\Delta A_{\text{空白}}=A1-A2=0$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PDH活性 (U/g 质量)} = 913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 109.66 \text{ U/g 质量}$$



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com