

丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）

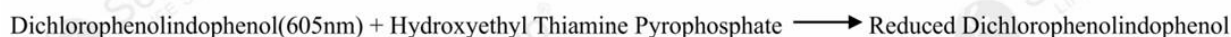
产品货号：BA1060

产品规格：100管/96样

产品说明：

PDH（EC 1.2.4.1）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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体0.6mL×2支	-20℃
试剂三	液体7.5mL×2瓶	2-8℃
试剂四	液体13mL×1瓶	2-8℃
试剂五	粉剂×2支	-20℃
试剂六	液体1mL×1支	2-8℃
试剂七	液体4mL×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5.75mL试剂四、一支试剂五、0.45mL试剂六、1.75mL试剂七转移到一瓶试剂三中共混合溶解待用（共15.45mL，约85T）；用不完的试剂-20℃分装保存，可保存4周。避免反复冻融。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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：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500万细胞或细菌到离心管内，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。



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

二、测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至605nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 每个样本需要180μL工作液，按样本数取出一定量的工作液于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中水浴10min。
3. 空白管：在微量比色皿或96孔板中加入180μL工作液和10μL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ΔA空白=A1-A2。空白管只需测1-2次。
4. 测定管：在微量比色皿或96孔板中加入180μL工作液和10μL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ΔA测定=A3-A4。

三、PDH活性计算

a. 用微量比色皿测定的计算公式如下

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。

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

$$= 904.762 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

$$= 913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

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

$$= 1.828 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

4. 按样本体积计算

单位的定义：每mL液体在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

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

$$= 904.762 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反应：反应体系总体积，1.9×10⁻⁴L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10⁴L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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。

b. 用96孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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

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

$$= 1809.524 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

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

$$= 1827.62 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

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

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

$$= 3.655 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$



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

4. 按样本体积计算

单位的定义：每mL液体在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 1809.524 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应体系总体积， 1.9×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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 ΔA 值在0.01-0.25之间，若测定管的 ΔA 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 ΔA 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试剂一的蛋白含量。

实验案例：

1. 取0.1g小鼠肝脏加入1mL试剂一和10 μ 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，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_3 - A_4 = 1.3106 - 1.1183 = 0.1923$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_1 - A_2 = 1.3325 - 1.3314 = 0.0011$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{PDH活性 (U/g 质量)} = 913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 1747 \text{ U/g 质量}$



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>