

丙酮酸脱氢酶（Pyruvate dehydrogenase, PDH）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

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600nm光吸收的减少。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一：100mL×1瓶，-20℃保存；

试剂二：20mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：1.5mL×1支，-20℃保存；

试剂四：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1瓶，4℃保存；

样本的前处理

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1. 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL试剂一和10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆600g，4℃离心5min。
3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
4. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的PDH（此步可选做）。
5. 在步骤④的沉淀中加入200uL试剂二和2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3秒，间隔10秒，重复30次），用于线粒体PDH活性测定。

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，蒸馏水调零。
2. 样本测定

(1) 在试剂五中加入19mL试剂四充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴10min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本和190μL试剂五，混匀，立即记录605nm处初始吸光值A1和 1min后的吸光值A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

PDH活性计算

a.用微量石英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1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 952 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{PDH活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 192 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

$$\text{PDH活性 (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.385 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，1 min；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组织蛋白每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1904 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{PDH活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 384 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

$$\text{PDH活性 (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.77 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，1 min；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。