

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

分光光度法 50 管/48 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。

### 组成:

产品名称	KC003-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	-20°C
试剂二: 液体	10ml	-20°C
试剂三: 液体	1ml	-20°C
试剂四: 液体	50ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 支	4°C
试剂六: 粉剂	1 支	4°C
试剂七: 粉剂	1 支	4°C
试剂八: 粉剂	1 支	4°C
说明书	一份	

工作液的配制: 临用前把试剂五、试剂六、试剂七和试剂八转移到试剂四中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

### 自备仪器和用品:

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

### 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 万细菌或细胞, 加入 1ml 试剂一和 10 $\mu$ l 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g, 4°C离心 5min。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



- 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 200μl 试剂二和 2μl 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 605nm 处，蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）中孵育 5min。
- 3、在 1ml 玻璃比色皿中加入 50μl 样本和 900μl 工作液，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：

#### (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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 905 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 182.8 \times \Delta A \div W$$

#### (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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.366 \times \Delta A$$

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，0.05 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。

