

丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0134	丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	-20℃
试剂二	液体 10mL × 1 瓶	-20℃
试剂三	液体 1mL × 1 瓶	-20℃
试剂四	液体 30mL × 1 瓶	4℃
试剂五	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 20mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的 20℃ 储存。	-20℃
试剂六	液体 6mL × 1 瓶	4℃, 避光

一、产品说明

丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase, 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-TTP, 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 WST-8 产生黄色物质, 从而导致 450nm 光吸收的增加。

二、自备材料

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

三、样品制备

- 1、称取约 0.1g 组织、或收集 500 万细胞/细菌, 加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂三, 冰浴匀浆后, 600g 4℃ 离心 5min。
- 2、取上清转移至另一离心管, 11000g 4℃ 离心 10min。
- 3、上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 PDH (此步骤可选做)。
- 4、向步骤 3 中的沉淀加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 超声破碎(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 离心取上清液待测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
- 2、按照试剂四: 试剂五: 试剂六=500 μ L: 300 μ L: 100 μ L 的比例, 根据样本量配制工作液, 临用前配制。
- 3、在 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μ L 样本液和 900 μ L 工作液, 充分混匀, 立即记录 450nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

五、PDH 活性的计算

1、标准曲线的建立: $y=13.586x-0.0009$, $R^2=0.9991$, 其中 y 为 ΔA , x 为浓度 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2、按照样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每 mg 组织蛋白每 min 还原 1nmol WST-8 定义为一个酶活单位。

$$\text{PDH (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 \\ = 368 \times \Delta A \div \text{Cpr}.$$

3、按照样本鲜重计算:

单位定义: 每 g 组织每 min 还原 1nmol WST-8 定义为一个酶活单位。

$$\text{PDH (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ = 74.3 \times \Delta A \div W.$$

4、按照细胞/细菌数量计算:

单位定义: 每 1 万个细胞/细菌每 min 还原 1nmol WST-8 定义为一个酶活单位。

$$\text{PDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ = 0.149 \times \Delta A.$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积; 0.1mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液总体积, 0.202mL ; T : 反应时间, 2min ; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g 。
 500 : 细胞/细菌数量, 500 万; 1000 : μmol 到 nmol 的转换系数。

六、注意事项

- 1、试剂五溶解后用不完的剩余, 最好分装 -20°C 储存。
- 2、试剂四: 试剂五: 试剂六的工作液要根据样本数量配制用量, 现用现配。