

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

（货号：BP10401F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

丙酮酸脱氢酶（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，把糖酵解和三羧酸循环连接起来。

丙酮酸脱氢酶（PDH）催化底物丙酮酸钠生成羟乙基-TPP，在电子传递体（PMS）存在下，使噻唑蓝（MTT）还原生成蓝色产物，通过检测该蓝色产物在 566nm 处的增加速率，即可得出 PDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 50mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃避光保存	
试剂四	粉剂 2 支	4℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 4 支	4℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支加 0.6mL 的蒸馏水溶解； 3. 一天内用完。
试剂六	粉剂 2 支	4℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解；一周内用完。
试剂七	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

1、样本提取：

1.1 线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境）：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 离心 10min。用移液器移除上清液（上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的酶活性（此步可选做）），留下沉淀（沉淀即为线粒体）。
- ③ 在沉淀（线粒体）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 3s，间隔 10 秒，重复 30 次），液体置于冰上用于丙酮酸脱氢酶活性测定。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细菌/细胞数量

(10^4)：提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

1.2 细菌/培养细胞：

先收集细菌到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌加入 1mL 试剂二，超声波破碎细菌（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）； 4°C ×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 (10^4)：试剂二 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取

1.3 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则于 12000rpm 4°C 离心 10min，取上

清，置冰上待测。

2、检测步骤：

- ① 分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 566nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	40
试剂四	40
试剂五	40
试剂六	40
试剂七	640
混匀， 30°C 下，10s 时于 566nm 处读取吸光值 A1，10min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定管 - $(A2 - A1)$ 对照管。	

五、结果计算：

1、线粒体制备样本的计算公式：

① 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活性单位。

PDH 活性(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 21.7 \times \Delta A \div W$

②按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活性单位。

PDH 活性(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 107.2 \times \Delta A \div Cpr$

③ 按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活单位。

PDH 活性(nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$

2、液体样本的计算公式：

① 按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活单位。

PDH 活性(nmol/min/mL)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div V1 \div T = 107.2 \times \Delta A$

ϵ ---还原型 MTT 的摩尔消光系数， 1.865×10^4 L/mol/cm；

d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积， 8×10^{-4} L；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。