

丙酮酸脱氢酶(PDH)活性检测试剂盒说明书

Pyruvate Dehydrogenase Assay Kit

微量法

货号: AK291

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK291-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK291-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK291-C	1.5mL×1 支	-20℃保存;
AK291-D	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK291-E	粉剂×1 瓶	4℃保存;
工作液配制	临用前在 AK291-E 中加入 19mL AK291-D 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 4℃保存一周;	

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase, PDH, EC 4.1.1.1) 是一种多酶体系 (丙酮酸脱氢酶、二氢硫辛酸乙酰转移酶和二氢硫辛酰胺脱氢酶), 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。丙酮酸彻底氧化分解需要先转变为乙酰辅酶 A, 这个过程由丙酮酸脱氢酶复合体(Pyruvate dehydrogenase complex) 催化。这个反应需要三种酶连续催化, 依次为: 丙酮酸脱氢酶、硫辛酸乙酰转移酶和硫辛酰胺脱氢酶。

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 605nm 光吸收的减少。

自备用品:

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、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 万细胞, 加入 1mL AK291-A 和 10uL AK291-C, 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 AK291-B 和 2uL AK291-C, 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. 工作液配制: 见产品组成表。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
工作液	190

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. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算：

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。

$$\text{PDH 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 952 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PDH 活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 192 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.385 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；
d：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. 使用 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。

$$\text{PDH 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1904 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PDH 活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 384 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.77 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-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，0.01 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。