北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D17151

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体60 mL×1瓶	4℃保存
试剂二	液体0.6 mL×1支	-20℃保存
试剂三	液体15mL×2瓶	4℃保存
试剂四	液体25mL×1瓶	4℃保存
试剂五	粉剂×2支	-20℃保存
试剂六	粉剂×2支	4℃保存
试剂七	液体8mL×1瓶	4℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存。
2. 试剂六：每支试剂六加入 1mL 蒸馏水溶解备用。
3. 工作液的配制：临用前把 11.5mL 试剂四、一支试剂五、0.9mL 试剂六、3.5mL 试剂七转移到一瓶试剂三中混合溶解待用；用不完的试剂-20℃分装保存，可以保存 4 周。

产品说明：

PDH（EC 4.1.1.1）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，催化丙酮酸脱梭生成羟乙基-TPP，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 2,6-二氯酚靛酚（2,6-DCPIP），从而导致 605nm 光吸收的减少。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

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

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 ℃ 11000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

细胞或者细菌样本：先收集 500 万细胞到离心管内，离心后弃上清；之后加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min）；然后 11000g，4℃，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

血清（浆）：直接检测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 605nm，蒸馏水调零。
2. 每个样本需要 900μL 工作液，按样本数+1 取出一定量的工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）中孵育 5min。

3. 空白管：在 1mL 比色皿中加入 900μL 工作液和 50μL 水，混匀，立即记录 605nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 ΔA 空白=A1-A2。

4. 测定管：在 1mL 比色皿中加入 900μL 工作液和 50μL 样本，混匀，立即记录 605nm 处初始吸光值 A3 和 1min 后的吸光值 A4，计算 ΔA 测定=A3-A4。

三、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 1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

PDH 活性（U/mg prot）=[(ΔA 测定-ΔA 空白)×V 反总÷(ε×d)×10⁹]÷(V 样×Cpr)÷T

=904.762×(ΔA 测定-ΔA 空白)÷Cpr

2．按样本质量计算

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

PDH 活性(U/g 质量)=[(ΔA 测定-ΔA 空白)×V 反总÷(ε×d)×10⁹]÷(W×V 样÷V 样总)÷T

=913.81×(ΔA 测定-ΔA 空白)÷W

3．按细菌或细胞数量计算

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

PDH 活性(U/10⁴ cell)=[(ΔA 测定-ΔA 空白)×V 反总÷(ε×d)×10⁹]÷(500×V 样÷V 样总)÷T

=1.828×(ΔA 测定-ΔA 空白)

4．按样本体积计算

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

PDH 活性(U/mL)=[(ΔA 测定-ΔA 空白)×V 反总÷(ε×d)×10⁹]÷V 样÷T=904.762×(ΔA 测定-ΔA 空白)

V 反总：反应体系总体积，9.5×10⁻⁴L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10⁴ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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。

注意事项：

1、 测定过程中所有样本在冰上放置并于 2 小时内检测，以免变性和失活。

2、测定管的 ΔA 值在 0.01-0.25 之间，若测定管的 ΔA 值大于 0.25，需将样本进行稀释。

3、由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约 1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去本身的蛋白含量。

实验实例：

1、取 0.1g 肺脏加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 ℃ 11000 g 离心 10min， 取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A3-A4=1.22[illegible]-1.01[illegible]=0.211，ΔA 空白=A1-A2 =1.442- 1.439=0.003，按样本质量计算酶活得：PDH 活性(U/g 质量)=913.81×(ΔA 测定-ΔA 空白)÷W=1900.72 U/g 质量。

2、取 0.1g 稗草加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 ℃ 11000 g 离心 10min， 取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A3-A4=1.39[illegible]-1.3[illegible]=0.012，ΔA 空白=A1-A2 =0，按样本质量计算酶活得：PDH 活性(U/g 质量)=913.81×(ΔA 测定-ΔA 空白)÷W=109.66[illegible] U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Peng S, Wang Y, Zhou Y, et al. Rare ginsenosides ameliorate lipid overload-induced myocardial insulin resistance via modulating metabolic flexibility[J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152745.

参考文献：

[1] Guitart M, Andreu A L, García-Arumi E, et al. FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes[J]. Mitochondrion, 2009, 9(4): 266-272.