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

微量法 100 管/96 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，催化丙酮酸脱梭生成羟乙基-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。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一：100mL×1 瓶，-20℃保存；
试剂二：20mL×1 瓶，-20℃保存；
试剂三：1.5mL×1 支，-20℃保存；
试剂四：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；
试剂五：粉剂×1 瓶，4℃保存；

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 试剂一和 10uL 试剂三，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 试剂二和 2uL 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、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 605nm，蒸馏水调零。
2、 样本测定

（1）在试剂五中加入 19mL 试剂四充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（2）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 190μL 试剂五，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=A1-A2。

PDH 活性计算

a.用微量石英比色皿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。

PDH 活性（nmol/min /mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=952×ΔA÷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。

PDH 活性(nmol/min /g 鲜重)＝[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T=192×ΔA÷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。

PDH 活性（nmol/min /10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.385×ΔA

V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，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.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。

PDH 活性（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=1904×ΔA÷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。

PDH 活性(nmol/min/g 鲜重)＝[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W× V 样÷V 样总)÷T=384×ΔA÷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。

PDH 活性（nmol/min /10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.77×ΔA

V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，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。