

植物丙酮酸脱氢酶 (PDH) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1876

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：植物组织、真菌

产品简介

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, 分布在线粒体基质中, 是由三个酶组合的复合体, 负责催化丙酮酸脱羧, 生成乙酰辅酶 A 的不可逆反应。PDH 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-TPP, 把糖酵解和三羧酸循环连接起来。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 PDH 活性检测方法, 其原理是 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。通过检测 450nm 吸光值的增加既可计算 PDH 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	-20℃ 避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光保存
试剂六	1.5mL	2.5mL	4℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计 (能测 450nm 处的吸光度)

96 孔板或微量比色皿、可调节式移液枪及枪头

水浴锅、制冰机, 低温离心机

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃ 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃ 保存。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; -20℃ 避光保存。

试剂五: 临用前 48T 加入 5mL 去离子水, 96T 加入 10mL 去离子水溶解待用; 分装后-20℃ 避光保存, 避免反复冻融。

工作液: 临用前配制, 按照试剂四: 试剂五: 试剂六=100 μL: 60 μL: 20 μL 的比例, 依样本数量配制工作液。用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 避免反复冻融。

样本制备

组织、真菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取:

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞, 加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三, 冰浴匀浆;

产品说明书

- 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
 - 再次离心上清，11,000 g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第5步操作；
 - 上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的丙酮酸脱氢酶（PDH）；
 - 在沉淀中加入200μL试剂二和2μL试剂三，充分重悬沉淀，用于线粒体丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测。
- 注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。**

实验步骤

- 酶标仪或分光光度计预热30min以上，调节波长到450nm。分光光度计去离子水调零。
- 工作液于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育10min。
- 样本测定：在96孔板中加入20μL样本和180μL工作液，混匀，立即记录450nm处初始吸光值 A_1 和2min后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意：1. 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 ΔA 小于0.001可适当加大样本量；如果 ΔA 大于0.3，可用试剂二稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

- 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）。
- 因通过反应速率计算酶活，使用96孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定4-8个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

标准曲线为 $y=6.7928x-0.0009$ ， $R^2=0.9991$ ；其中 y 为 ΔA ， x 为浓度 $\mu\text{mol/mL}$ 。

1. 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟还原1nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH}_{\text{上清}} (\text{U/g 鲜重}) = (\Delta A_{\text{上清}} + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 1000 = 743.43 \times (\Delta A_{\text{上清}} + 0.0009) \div W$$

$$\text{PDH}_{\text{沉淀}} (\text{U/g 鲜重}) = (\Delta A_{\text{沉淀}} + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 148.69 \times (\Delta A_{\text{沉淀}} + 0.0009) \div W$$

$$\text{PDH}_{\text{总}} (\text{U/g 鲜重}) = \text{PDH}_{\text{上清}} + \text{PDH}_{\text{沉淀}} = 743.43 \times (\Delta A_{\text{上清}} + 0.0009) \div W + 148.69 \times (\Delta A_{\text{沉淀}} + 0.0009) \div W$$

2. 按真菌密度计算

单位的定义：每1万个真菌每分钟还原1nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH}_{\text{上清}} (\text{U}/10^4 \text{ cells}) = (\Delta A_{\text{上清}} + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 1000 = 1.487 \times (\Delta A_{\text{上清}} + 0.0009)$$

$$\text{PDH}_{\text{沉淀}} (\text{U}/10^4 \text{ cells}) = (\Delta A_{\text{沉淀}} + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 0.297 \times (\Delta A_{\text{沉淀}} + 0.0009)$$

$$\text{PDH}_{\text{总}} (\text{U}/10^4 \text{ cells}) = \text{PDH}_{\text{上清}} + \text{PDH}_{\text{沉淀}} = 1.487 \times (\Delta A_{\text{上清}} + 0.0009) + 0.297 \times (\Delta A_{\text{沉淀}} + 0.0009)$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：样本总体积，0.202mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01mL； T ：反应时间，5min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：真菌总数，500万；1000， μmol 到nmol的转换系数。

注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
- 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
- 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
- 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）检测试剂盒（微量法）

PMK1115 乳酸（LA）检测试剂盒（微量法）

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

