

丙酮酸脱氢酶（PDH）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1110

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动物组织、细胞

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2,6-二氯酚靛酚（2,6-DCPIP），从而导致605nm光吸收的减少。通过检测605nm吸光值的下降既可计算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	9.5mL	19mL	4℃保存
试剂五	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测605nm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。

工作液：临用前配制，将试剂五全部转移到试剂四中，充分混匀溶解待用，配制好的工作液可以4℃避光保存一周，如需长期保存，可分装后-20℃避光保存，避免反复冻融，使用前请平衡到室温。

样本制备

组织、细胞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；
2. 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；
3. 再次离心上清，11,000g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第5步操作；
4. 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）；
5. 在沉淀中加入200μL试剂二和2μL试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测。

产品说明书

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

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 605nm。分光光度计去离子水调零。
2. 工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10min。
3. 在 96 孔板或微量比色皿中依次加入 10μL 样本和 190μL 工作液，充分混匀后，于 605nm 检测，记录 20s 和 1min20s 的吸光值，分别记为 A_1 和 A_2 ，计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。

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。

2. 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）。
3. 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

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

PDH 上清活性(U/g 鲜重)=[$\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W$) \div T=1923.8 \times $\Delta A_{\text{上清}} \div W$

PDH 沉淀活性(U/g 鲜重)=[$\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W$) \div T=384.76 \times $\Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

总 PDH 活性(U/g 鲜重)=PDH 上清活性+PDH 沉淀活性=1923.8 \times $\Delta A_{\text{上清}} \div W$ +384.76 \times $\Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

2. 按细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

PDH 上清活性(U/ 10^4 cells)=[$\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500$) \div T=3.85 \times $\Delta A_{\text{上清}}$

PDH 沉淀活性(U/ 10^4 cells)=[$\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500$) \div T=0.77 \times $\Delta A_{\text{沉淀}}$

总 PDH 活性(U/ 10^4 cells)=PDH 上清活性+PDH 沉淀活性=3.85 \times $\Delta A_{\text{上清}}$ +0.77 \times $\Delta A_{\text{沉淀}}$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚摩尔消光系数， 21×10^3 mol/L/cm；d：96 孔板光径，0.5cm； 10^9 ：1 mol= 1×10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL；T：反应时间，1min； $\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01mL；W：样品质量，g； $\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂二和试剂三的总体积，0.202mL；500：细胞总数，500 万。

B. 使用微量比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d：0.5cm 调整为 d：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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：

