

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

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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，催化丙酮酸脱羧生成羟乙基-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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：1mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 支，4℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，4℃保存；

试剂七：粉剂×1 支，4℃保存；

试剂八：粉剂×1 支，4℃保存；

工作液的配制：临用前把试剂五、试剂六、试剂七和试剂八转移到试剂四中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

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 万细菌或细胞，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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 605nm 处，蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）中孵育 5min。
- 3、在 1mL 玻璃比色皿中加入 50μL 样本和 900μL 工作液，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:

(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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 905 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 182.8 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.366 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 9.5×10^{-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, 0.05 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。