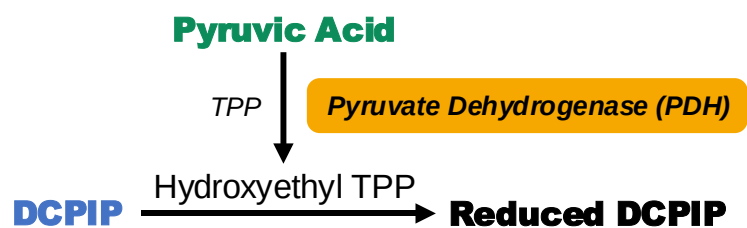




丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒

Pyruvate Dehydrogenase (PDH) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒

Pyruvate Dehydrogenase (PDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

丙酮酸脱氢酶（PDH）作为丙酮酸代谢为乙酰辅酶 A 过程的限速酶，在丙酮酸脱氢酶复合体（PDHC）催化丙酮酸氧化脱羧生成乙酰-CoA 能量代谢过程中起着关键的转折作用，能够将糖酵解和三羧酸循环连接起来，其酶活性的测定对于丙酮酸脱氢酶系特性研究、丙酮酸代谢异常相关疾病分析，以及除草剂和杀菌剂开发等具有重要意义。

丙酮酸脱氢酶能够催化丙酮酸脱羧生成羟乙基-TPP，能够将 2,6-二氯酚靛酚（2,6-DCPIP）还原，2,6-二氯酚靛酚在 605 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征丙酮酸脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 600 μL×1 支	-20°C 避光保存	含易挥发组分 (使用后尽快密封, -20°C 保存)
试剂三	液体 15 mL×2 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 支	-20°C 保存	-
试剂六	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂七	液体 8 mL×1 瓶	4°C 保存	-
PDH 工作液的配制：使用前取一支试剂五加入一瓶试剂三中，再分别加入 11.5 mL 试剂四、0.9 mL 试剂六和 3.5 mL 试剂七充分混匀即为 PDH 工作液。 (未使用完的 PDH 工作液建议分装后-20°C 保存，有效期 1 个月)			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量）

①组织：称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一和 10 μL 试剂二，冰浴充分研磨至匀浆，4°C 11000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集 500 万细菌或细胞至离心管内，加入 1 mL 试剂一和 10 μ L 试剂二，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min），4°C 11000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 605 nm，蒸馏水调零。

②根据使用量取出 PDH 工作液 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）预热 10 min。

③在 1 mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μ L)	空白组 (μ L)
PDH 工作液	900	900
粗酶液	50	-
蒸馏水	-	50

吸光值测定：①立即混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）605 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②准确反应 60 s 后，测定 70 s 时（总时间）605 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定 = A1 测定 - A2 测定， ΔA 空白 = A1 空白 - A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.丙酮酸脱氢酶（PDH）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：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。

$$\text{PDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{904.762 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{PDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{913.81 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 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。

$$\text{PDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{913.81 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

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

$$\text{PDH (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 904.762 \times \Delta A$$

注释： V 反总：反应体系总体积， 9.5×10^{-4} L；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；
V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01 mL； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；
d：1 mL 玻璃比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，1 min。

四、注意事项

- ①测定过程中所有样本均需置于冰上放置并尽快完成，以免变性和失活；
- ②准确在 10 s 和 60 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；
- ③ ΔA 测定应在 0.01-0.25 之间：若 ΔA 测定大于 0.25，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.01，建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ④试剂一中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样品蛋白浓度时需要减去试剂一的蛋白含量；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China
TEL: 400-805-8228
E-MAIL: techsupport@boxbio.cn
Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

