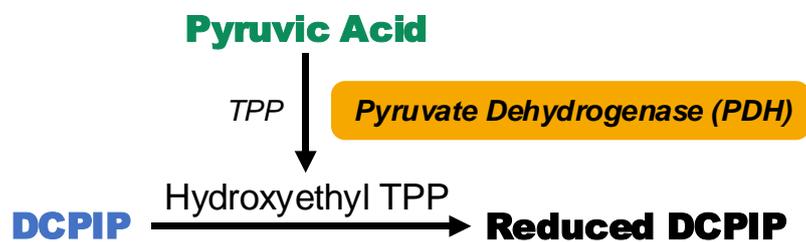




丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
Pyruvate Dehydrogenase (PDH) Activity Assay Kit



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 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 0.6 mL×2 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 7.5 mL×2 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 13 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 支	-20°C 保存	-
试剂六	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	-
试剂七	液体 4 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 5.75 mL 试剂四、0.45 mL 试剂六和 1.75 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/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、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 μL 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分光光度计或酶标仪预热 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在微量玻璃比色皿或 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
PDH 工作液	180	180
粗酶液	10	-
蒸馏水	-	10

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.丙酮酸脱氢酶（PDH）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

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。

$$\text{PDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{1809.52 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：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。

$$\text{PDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{1827.62 \times \Delta A}{W}$$

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。

$$\text{PDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{1827.62 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

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。

$$\text{PDH (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 1809.52 \times \Delta A$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

将上述公式中 96 孔板光径 ($d_1=0.5 \text{ cm}$) 改为微量玻璃比色皿光径 ($d_2=1 \text{ cm}$) 进行计算即可。

注释： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $1.9 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液的体积， 0.01 mL ；

$V_{\text{样总}}$ ：加入试剂一和试剂二体积， 1.01 mL ； ϵ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ；

d_1 ：96 孔板光径， 0.5 cm ； d_2 ：微量玻璃比色皿光径， 1 cm ； C_{pr} ：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；若使用 96 孔板测定应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

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.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

