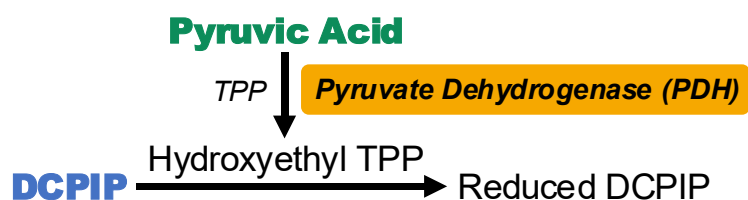




丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒

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，是一个极其关键的酶复合体，在细胞能量代谢中扮演枢纽角色，特别是在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，是糖酵解和三羧酸循环的分子桥梁，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 1.2 mL×1 支	-20°C避光保存	易挥发组分，使用后密封保存
试剂三	液体 7.5 mL×2 瓶	4°C避光保存	-
试剂四	液体 13 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂五	粉剂×2 支	-20°C避光保存	-
试剂六	液体 1 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂七	液体 4 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
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 工作液分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

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 μ L 试剂二，冰浴充分研磨至匀浆，4°C 11000 g 离心 10 min，取上清液即为粗酶液，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，取上清液即为粗酶液，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酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 605 nm。

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 96 孔板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	180	180
粗酶液	10	-
蒸馏水	-	10

吸光值测定：①充分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室温准确反应 60 s，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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

注释： V 反总：反应体系总体积， 1.9×10^{-4} L；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 样总：提取过程中加入试剂一和试剂二的体积，1.01 mL； ϵ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞代入 500 即可；T：酶促反应时间，1 min；D：待测样本稀释倍数，若未稀释则为 1。

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测定，以免变性和失活；
- ②准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若样本较多可（使用多道移液器）分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ③若 A1 测定大于 1.0 或 ΔA 测定大于 0.25，建议将粗酶液使用蒸馏水适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.01，建议适当延长酶促反应时间（室温准确反应 60 s，可以延长至 10 min 以上）或制备更高浓度的样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ④试剂一中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样本蛋白含量后需减去试剂一自身的蛋白含量；
- 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.

