



## 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0385

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体110 mL×1瓶	2-8°C保存
试剂二	液体0.6 mL×2支	-20°C保存
试剂三	液体7.5mL×2瓶	2-8°C保存
试剂四	液体13mL×1瓶	2-8°C保存
试剂五	粉剂×2支	-20°C保存
试剂六	液体1mL×1支	2-8°C保存
试剂七	液体4mL×1瓶	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20°C保存。

2. 工作液的配制：临用前把 5.75mL 试剂四、一支试剂五、0.45mL 试剂六、1.75mL 试剂七转移到一瓶试剂三中混合溶解待用（共 15.45mL，约 85T）；用不完的试剂-20°C分装保存，可保存 4 周。避免反复冻融。

**产品说明：**

PDH（EC 4.1.1.1）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。

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。



Dichlorophenolindophenol(605nm) + Hydroxyethyl Thiamine Pyrophosphate  $\longrightarrow$  Reduced Dichlorophenolindophenol

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 °C 11000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. 细胞或者细菌样本：先收集 500 万细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；之后加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min）；然后 11000g，4 $^{\circ}$ C，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

3. 血清（浆）及其它液体样本：直接检测。若溶液有浑浊则离心后去上清进行测定。

## 二、测定步骤

1、可见分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 605nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、每个样本需要 180 $\mu$ L 工作液，根据实验所需取出一定量工作液置于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）水浴锅中水浴 10min。

3、空白管：在微量比色皿或 96 孔板中加入 180 $\mu$ L 工作液和 10 $\mu$ L 水，混匀，立即记录 605nm 处 10s 处吸光值 A1 和 1min10s 后的吸光值 A2，计算  $\Delta A$  空白=A1-A2。空白管只需测 1-2 次。

4、测定管：在微量比色皿或 96 孔板中加入 180 $\mu$ L 工作液和 10 $\mu$ L 样本，混匀，立即记录 605nm 处 10s 处吸光值 A3 和 1min10s 后的吸光值 A4，计算  $\Delta A$  测定=A3-A4。

## 三、PDH 活性计算

### a.用微量比色皿测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{PDH 活性 (U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 904.762 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{PDH 活性 (U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 913.81 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

3. 按细菌或细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{PDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T \\ &= 1.828 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

4. 按样本体积计算

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

$$\begin{aligned} \text{PDH 活性 (U/mL)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 904.762 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，1.9 $\times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数，2.1 $\times 10^4$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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。

### b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{PDH 活性 (U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 1809.524 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

## 2. 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned}\text{PDH 活性 (U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 1827.62 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

## 3. 按细菌或细胞数量计算

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

$$\begin{aligned}\text{PDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T \\ &= 3.655 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})\end{aligned}$$

## 4. 按样本体积计算

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

$$\begin{aligned}\text{PDH 活性 (U/mL)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1809.524 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， $1.9 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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。

### 注意事项：

- 1、测定过程中所有样本在冰上放置并于 2 小时内检测，以免变性和失活。
- 2、测定管的  $\Delta A$  值在 0.01-0.25 之间，若测定管的  $\Delta A$  值大于 0.25，需将样本进行稀释。计算公式中乘以稀释倍数。若测定管的  $\Delta A$  值小于 0.01，需加大样本量后重新测定，注意同步修改计算公式。
- 3、由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约 1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去试剂一的蛋白含量。

### 实验实例：

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4 $^{\circ}$ C、11000g 离心 10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定=A3-A4=1.3106-1.1183=0.1923， $\Delta A$  空白=A1-A2=1.3325-1.3314=0.0011，按样本质量计算酶活得：  
PDH 活性(U/g 质量)=  $913.81 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 1747$  U/g 质量。

### 相关发表文献：

[1] Peng S, Wang Y, Zhou Y, et al. Rare ginsenosides ameliorate lipid overload-induced myocardial insulin resistance via modulating metabolic flexibility[J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152745.

### 参考文献：

[1] Guitart M, Andreu A L, García-Arumi E, et al. FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes[J]. Mitochondrion, 2009, 9(4): 266-272.

### 相关系列产品：

- BC0710/BC0715  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶（ $\alpha$ -KGDH）活性检测试剂盒
- BC2150/BC2155 柠檬酸（CA）含量检测试剂盒
- BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒

