

丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC0380

规格：50T/48S

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。

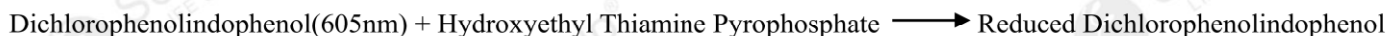
试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 15 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂六	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
2. 工作液的配制：临用前把 11.5mL 试剂四、一支试剂五、0.9mL 试剂六、3.5mL 试剂七转移到一瓶试剂三中混合溶解待用（共 30.9mL，约 34T）；用不完的试剂-20℃分装保存，可保存 4 周。避免反复冻融。

产品说明：

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。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。



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。

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、1mL 玻璃比色皿、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. 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 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 万细菌/细胞到离心管内，离心后弃上清；之后加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min）；然后 11000g，4℃，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. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 605nm，蒸馏水调零。
2. 每个样本需要 900μL 工作液，按实验所需取出一定量工作液于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）水浴锅中水浴 10min。
3. 空白管：在 1mL 比色皿中加入 900μL 工作液和 50μL 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 $\Delta A_{\text{空白}} = A1 - A2$ 。空白管只需测 1-2 次。
4. 测定管：在 1mL 比色皿中加入 900μL 工作液和 50μL 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A3 - A4$ 。

三、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 1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

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

2. 按样本质量计算

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

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

3. 按细菌或细胞数量计算

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

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

4. 按样本体积计算

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

$$\text{PDH 活性 (U/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 904.762 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V 反总：反应体系总体积， 9.5×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05mL；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 ΔA 值在 0.01-0.25 之间，若测定管的 ΔA 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 ΔA 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 肺脏加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 11000g 离心 10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_3 - A_4 = 1.226 - 1.015 = 0.211$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_1 - A_2 = 1.442 - 1.439 = 0.003$ ，按样本质量计算酶活得：

PDH 活性(U/g 质量) = $913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 1900.72$ U/g 质量。

2、取 0.1g 稗草加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 11000 g 离心 10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_3 - A_4 = 1.391 - 1.379 = 0.012$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_1 - A_2 = 0$ ，按样本质量计算酶活得：

PDH 活性(U/g 质量) = $913.81 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 109.66$ U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Ma WY, Wu QL, Wang SS, Wang HY, Ye JR, Sun HS, Feng ZP, He WB, Chu SF, Zhang Z, Chen NH. A breakdown of metabolic reprogramming in microglia induced by CKLF1 exacerbates immune tolerance in ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2023 Apr 25;20(1):97. doi: 10.1186/s12974-023-02779-w. PMID: 37098609; PMCID: PMC10127063.

[2] Yu T, Li G, Wang C, Gong G, Wang L, Li C, Chen Y, Wang X. MIR210HG regulates glycolysis, cell proliferation, and metastasis of pancreatic cancer cells through miR-125b-5p/HK2/PKM2 axis. *RNA Biol*. 2021 Dec;18(12):2513-2530. doi: 10.1080/15476286.2021.1930755. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34110962; PMCID: PMC8632125.

[3] Xu N, Lu B, Wang Y, Yu X, Yao N, Lin Q, Xu X, Lu B. Effects of salt stress on seed germination and respiratory metabolism in different *Flueggea suffruticosa* genotypes. *PeerJ*. 2023 Jul 19; 11: e15668. doi: 10.7717/peerj.15668. PMID: 37483969; PMCID: PMC10362856.

[4] Jing Z, Liu Q, He X, Jia Z, Xu Z, Yang B, Liu P. NCAPD3 enhances Warburg effect through c-myc and E2F1 and promotes the occurrence and progression of colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 Jun 11;41(1):198. doi: 10.1186/s13046-022-02412-3. PMID: 35689245; PMCID: PMC9188166.

[5] Ma Z, Ding Y, Ding X, Mou H, Mo R, Tan Q. PDK4 rescues high-glucose-induced senescent fibroblasts and promotes diabetic wound healing through enhancing glycolysis and regulating YAP and JNK pathway. *Cell Death Discov*. 2023 Nov 25;9(1):424. doi: 10.1038/s41420-023-01725-2. PMID: 38001078; PMCID: PMC10674012.

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 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -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

