

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℃保存
试剂二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 7.5 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 13 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂六	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存

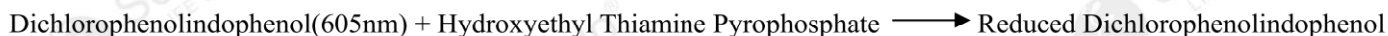
溶液的配制：

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 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℃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/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 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 万细胞或细菌到离心管内，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 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min）；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 180μL 工作液, 根据实验所需取出一定量工作液置于 37°C (哺乳动物) 或 25°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 180μL 工作液和 10μL 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 ΔA 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 180μL 工作液和 10μL 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 ΔA 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, 1.9×10^{-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, 0.01mL; 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， 1.9×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：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 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 小鼠肝脏加入 1mL 试剂一和 10 μ L 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，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A \text{ 测定} = A3 - A4 = 1.3106 - 1.1183 = 0.1923$ ， $\Delta A \text{ 空白} = A1 - A2 = 1.3325 - 1.3314 = 0.0011$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{PDH 活性 (U/g 质量)} = 913.81 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 1747 \text{ U/g 质量}。$

相关发表文献：

- [1] Liu WX, Liu HN, Weng ZP, Geng Q, Zhang Y, Li YF, Shen W, Zhou Y, Zhang T. Maternal vitamin B1 is a determinant for the fate of primordial follicle formation in offspring. Nat Commun. 2023 Nov 16;14(1):7403. doi: 10.1038/s41467-023-43261-8. PMID: 37973927; PMCID: PMC10654754.
- [2] Lin D, Zhu L, Yao Y, Zhu L, Wang M. The ecological and molecular mechanism underlying effective reduction of antibiotic resistance genes pollution in soil by fermentation broth from fruit and vegetable waste. J Hazard Mater. 2023 Jun 5; 451:131201. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131201. Epub 2023 Mar 12. PMID: 36931215.
- [3] Yu L, Lin Z, Cheng X, Chu J, Li X, Chen C, Zhu T, Li W, Lin W, Tang W. Thorium inhibits human respiratory chain complex IV (cytochrome c oxidase). J Hazard Mater. 2022 Feb 15;424(Pt B):127546. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127546. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34879532.
- [4] Lin D, Huang D, Zhang J, Yao Y, Zhang G, Ju F, Xu B, Wang M. Reduction of antibiotic resistance genes (ARGs) in swine manure-fertilized soil via fermentation broth from fruit and vegetable waste. Environ Res. 2022





Nov;214(Pt 1):113835. doi: 10.1016/j.envres.2022.113835. Epub 2022 Jul 8. PMID: 35810807.

[5] Meng L, Lu C, Wu B, Lan C, Mo L, Chen C, Wang X, Zhang N, Lan L, Wang Q, Zeng X, Li X, Tang S. Taurine Antagonizes Macrophages M1 Polarization by Mitophagy-Glycolysis Switch Blockage via Dragging SAM-PP2Ac Transmethylation. Front Immunol. 2021 Apr 12;12:648913. doi: 10.3389/fimmu.2021.648913. PMID: 33912173; PMCID: PMC8071881.

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



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.