

丙酮酸脱氢酶（PDH）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

PDH 催化丙酮酸脱氢，同时还原 WST-8 产生黄色物质，从而导致 450nm 光吸收的增加。

试剂组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：1mL×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存，临用前加入 20mL 蒸馏水溶解待用，用不完的-20℃ 保存；

试剂六：液体 6mL×1 瓶，4℃ 避光保存；

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4℃ 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。
- 4、上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 PDH（此步可选做）。
- 5、在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），用于线粒体 PDH 活性测定。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm 处, 蒸馏水调零。
- 2、按照试剂四: 试剂五: 试剂六=500 μ L: 300 μ L: 100 μ L 的比例, 依样本数量配制工作液, 临用前配制。
- 3、在 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μ L 样本和 900 μ L 工作液, 混匀, 立即记录 450nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

PDH 活性计算:

标准曲线为 $y = 13.5856x - 0.0009$, $R^2 = 0.9991$; 其中 y 为 ΔA , x 为浓度 $\mu\text{mol/mL}$ 。

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟还原 1 nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 368 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟还原 1 nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 74.3 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟还原 1 nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/104 cell)} &= (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 0.149 \times \Delta A \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 0.202 mL;

T : 反应时间, 2 min;

C_{pr} : 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;

1000, μmol 到 nmol 的转换系数。