

丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase, PDH) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

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。

需自备的仪器和用品

酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一: 100mL×1 瓶, -20°C 保存;

试剂二: 20mL×1 瓶, -20°C 保存;

试剂三: 1.5mL×1 支, -20°C 保存;

试剂四: 液体 20mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂五: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存, 临用前加入 10mL 蒸馏水溶解待用, 用不完的-20°C 保存;

试剂六: 液体 2.5mL×1 瓶, 4°C 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°C 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C 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、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

2、样本测定

(1) 按照试剂四: 试剂五: 试剂六=100μL: 60μL: 20μL 的比例, 依样本数量配制工作液, 临用前配制。

(2) 在 96 孔板中加入 20μL 样本和 180μL 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 $y = 6.7928x - 0.0009$, $R^2 = 0.9991$; 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。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 736 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\text{PDH (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ = 148.7 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PDH (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} = (\Delta A + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ = 0.297 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；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；1000， μmol 到 nmol 的转换系数。