

丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase, PDH)

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

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。

$$\begin{aligned} \text{PDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0009) \div 13.5856 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &\div T \times 1000 \\ &= 0.149 \times \Delta A \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 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。