

CheKine™ 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1270

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞和细菌
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate Dehydrogenase, PDH) (EC 1.2.4.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 它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。

本试剂盒检测原理是 PDH 可以催化丙酮酸脱氢, 并还原 2,6-二氯靛酚 (2,6-DCPIP), 2,6-二氯靛酚的变化可以通过读取 605 nm 处的光吸收来检测, 通过计算 2,6-二氯靛酚的减少速率即可得到 PDH 的酶活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer I	60 mL	60 mL×2	4℃
Extraction Buffer II	0.75 mL	1.5 mL	-20℃, 避光保存
Reagent I	11.4 mL	22.8 mL	4℃
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 605 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS	样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、制冰机、低温离心机、水浴锅、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Extraction Buffer II	即用型；使用前平衡到室温	-20℃避光保存；Extraction Buffer II 具有一定的毒性，请操作时做好防护措施
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存

05-2 样本制备

注意：1.推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。处理好的样本须当天检测。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

2.提取液中含有使蛋白变性的成分，若按蛋白浓度计算时，需要重新用去离子水提取蛋白进行测定。

- 动植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer I 和 10 μL Extraction Buffer II，冰浴匀浆 11000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 细胞或细菌：收集 5×10⁶ 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Extraction Buffer I 和 10 μL Extraction Buffer II 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），11000 g，4℃离心 10 min，取上清置于冰上待测。

05-3 实验步骤

注意：1.Reagent II具有一定的毒性，请操作时做好防护措施。

2.因通过单位时间内吸光值变化计算酶活，不推荐同时测多个样本。

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 605 nm。

2. 工作液的配制：临用前配制，将 Reagent II 和 Reagent III全部转移到 Reagent I 中，充分混匀溶解待用。用不完的工作液-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。检测前，工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10 min。

3. 检测体系配制：在 96 孔板中依次加入 10 μL 样本、190 μL 工作液。

4. 吸光度检测：充分混匀，测定 605 nm 处吸光值。记录第 20 s 和 5 min 20 s 时吸光值，分别记录为 A₁ 和 A₂。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_1 - A_2$

2. 样本 PDH 活性计算

● 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 1 nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

PDH 活性(U/g)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W$)÷T=384.76× $\Delta A \div W$

● 按细胞或细菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞或细菌在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

PDH 活性(U/10⁴)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times N$)÷T=384.76× $\Delta A \div N$

● 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 1 nmol 2,6-二氯酚定义为一个酶活性单位。

PDH 活性(U/mg prot)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times Cpr$)÷T=384.76× $\Delta A \div Cpr$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L； ϵ ：2,6-二氯酚摩尔消光系数，21×10³ L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL；T：反应时间，5 min； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01 mL；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹ nmol；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；N：细胞或细菌总数，以 10⁴ 为单位（例如细胞数量为 5×10⁶，N=500）。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 小鼠肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_1 - A_2 = 0.170 - 0.111 = 0.059$ 。

按样本质量计算得：PDH 活性(U/g)=384.76× $\Delta A \div W = 227.008$ U/g。

示例-2：取 0.1 g 小鼠胃，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_1 - A_2 = 0.145 - 0.083 = 0.062$ 。

按样本质量计算得：PDH 活性(U/g)=384.76× $\Delta A \div W = 238.55$ U/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办？

ΔA 应在 0.01-0.3 之间，如果ΔA 小于 0.01 可适当加大样本量或延长反应时间 10-15 min。如果ΔA 大于 0.3，样本可用 Extraction Buffer I 进一步稀释，或减少样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1023	CheKine™ 柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1230	CheKine™ 琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1240	CheKine™ α-酮戊二酸脱氢酶（α-KGDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1250	CheKine™ 线粒体异柠檬酸脱氢酶（ICDHm）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1270)

