（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K500-M

产品规格：48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(330-350 nm)

Elabscience®丙酮酸脱羧酶（PDC）比色法测试盒

Pyruvate Decarboxylase (PDC) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆以及动植物组织和细胞样本中丙酮酸脱羧酶（PDC）的活力。

检测原理

丙酮酸脱羧酶（PDC）主要存在于酵母中，是乙醇发酵的关键酶之一。PDC 催化丙酮酸脱羧生成乙醛，乙醛在乙醇脱氢酶（ADH）作用下发生反应，同时催化 NADH 转化成 NAD^+，NADH 在 340 nm 有特征吸收峰，可通过测定 340 nm 光吸收下降速率来计算 PDC 活性。

本试剂盒检测组织样本和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	**名称**	**规格 1 (Size 1)(48 T)**	**规格 2 (Size 2)(96 T)**	**保存方式 (Storage)**
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光保存 6 个月
	96 孔 UV 酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(330-350 nm，最佳检测波长 340 nm)，低温离心机

试剂：生理盐水（0.9%NaCl）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

将一瓶试剂二加入5 mL双蒸水，混匀，置于冰盒上避光待用，未用完部分-20°C避光可保存3天，避免反复冻融。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入 1.2 mL 双蒸水，混匀，置于冰盒上避光待用，未用完部分-20°C 保存 7 天，避免反复冻融。

④ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入 1.2 mL 双蒸水，混匀，置于冰盒上避光待用，未用完部分-20°C 保存 3 天，避免反复冻融。

⑤ 反应工作液的配制：

按试剂二工作液：试剂三工作液：试剂四工作液体积比=1: 1: 1 混匀配制，现配现用，按需配制。

样本准备

① 样本处理

组织样本：称取 0.1 g 组织样本，加入 0.9 mL 生理盐水（0.9%NaCl），匀浆后 12000 × g 4°C 离心 10 min，上清液用于测定，留取部分样本上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入 200 μL 生理盐水（0.9%NaCl），匀浆后 12000 × g 4°C 离心 10 min，上清液用于测定，留取部分样本上清用于蛋白浓度测定。

血清(浆)等液体样品：直接测定（若样本体系浑浊，可进行适当离心）。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.67-27.73 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	25-50	10%小鼠肾组织	25-50
10%小鼠心组织	25-50	大鼠血清	不稀释
兔血浆	不稀释	1×10^6 个 HL-60 细胞	3-5

注：稀释液为生理盐水（0.9%NaCl）。

实验关键点

① 所有的试剂严格避光保存，避免反复冻融。

② 单位时间（min）的变化 OD 控制在 0.2 以内。

操作步骤

① 空白孔：取 20 μL 双蒸水加入空白孔中，
测定孔：取 20 μL 待测样本加入测定孔中，

② 向步骤①中空白孔与测定孔加入 120 μL 试剂一，

③ 向步骤②中各孔加入 60 μL 反应工作液，

④ 酶标仪 340 nm 波长下测定空白孔和测定孔 1 min 的 OD 值 A_1 和 3 min 的 OD 值 A_2，并计算变化 OD 值ΔA，$\Delta A=A_1-A_2$。

操作表

	空白孔	测定孔
双蒸水(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂一(μL)	120	120
反应工作液(μL)	60	60
酶标仪 340 nm 波长下测定空白孔和测定孔 1 min 的 OD 值 A_1 和 3 min 的 OD 值 A_2，并计算变化 OD 值ΔA，$\Delta A=A_1-A_2$。		

本试剂盒检测组织样本和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

组织或细胞样本中丙酮酸脱羧酶(PDC)活力计算公式：

定义：25°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化 NADH 产生 1 μmol NAD 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{PDC 活力 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{测} - \Delta A_{空白}}{\varepsilon \times d} \div C_{pr} \div T \times f \times 10^6$$

血清血浆样本丙酮酸脱羧酶(PDC)活力计算公式：

定义：25°C 条件下，每升血清/血浆每分钟催化 NADH 产生 1 μmol NAD 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{PDC 活力 (U/L)} = \frac{\Delta A_{测} - \Delta A_{空白}}{\varepsilon \times d} \div T \times f \times 10^6$$

注解：

$\Delta A_{测}$：测定孔变化 OD 值 A_1-A_2

$\Delta A_{空白}$：空白孔变化 OD 值 A_1-A_2

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/(mol•cm)

d：酶标板光径，0.6 cm

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

T：反应时间，2 min

10^6：1 mol = 10^6 μmol

附录 1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.67-27.73 U/L	**平均批间差**	3.1 %
灵敏度	0.67 U/L	**平均批内差**	2.8 %
平均回收率	105 %		

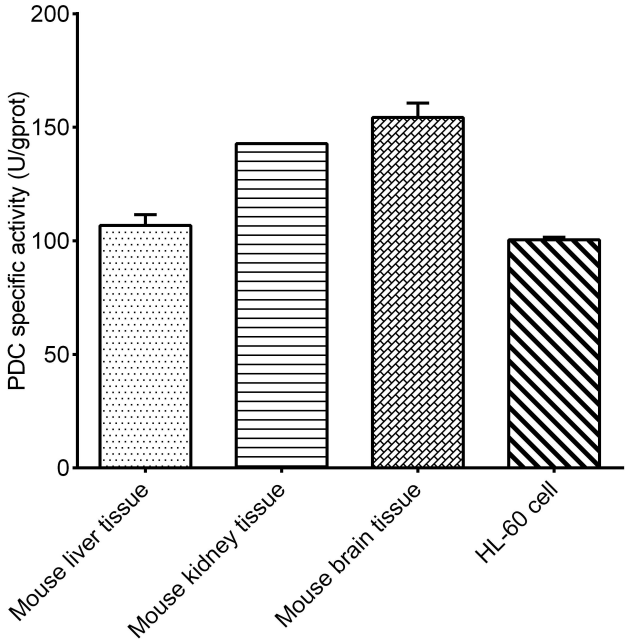
附录 2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考)：

取稀释 50 倍的 10%小鼠肝组织匀浆上清 20 μL，按说明书操作表操作，结果如下：空白孔 1 min 时的 OD 值为 1.054，3 min 时的 OD 值为 1.053，测定孔 1 min 时的 OD 值为 0.674，3 min 时的 OD 值为 0.448，10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为 14.18 gprot/L 计算结果如下：

PDC 活力(U/gprot) = ((0.674-0.448) - (1.054-1.053)) ÷ (6220 × 0.6) ÷ 14.18 × 50 ÷ 2 × 10^6 = 106.29 U/gprot

按说明书操作，测定小鼠肝组织(10%组织匀浆稀释 50 倍，蛋白浓度 14.18 gprot/L，加样量 20 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆稀释 50 倍，蛋白浓度 13.37 gprot/L，加样量 20 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆稀释 50 倍，蛋白浓度 5.99 gprot/L，加样量 20 μL)、HL-60 细胞(1×10^6 个细胞，稀释 3 倍，加样量为 20 μL)中的 PDC 酶活(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
空白 OD 值小于 0.8	试剂四工作液失效	保证工作液现配现用
样本测试初始值小于 0.8	样本酶活较高	对样本进行稀释

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。