

(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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://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<sup>+</sup>，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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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，不同试剂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℃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℃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℃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  $12000 \times g$  4℃ 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  $1 \times 10^6$  个细胞加入 200  $\mu$ L 生理盐水 (0.9%NaCl)，匀浆后  $12000 \times g$  4℃ 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	$1 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$  双蒸水加入空白孔中，  
测定孔：取 20  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  试剂一，
- ③ 向步骤②中各孔加入 60  $\mu\text{L}$  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  $\Delta A$ ， $\Delta A=A_1-A_2$ 。

## 操作表

	空白孔	测定孔
双蒸水( $\mu\text{L}$ )	20	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	20
试剂一( $\mu\text{L}$ )	120	120
反应工作液( $\mu\text{L}$ )	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 $\Delta A$ ， $\Delta A=A_1-A_2$ 。		

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: 37℃ 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。

$$\text{PDC 活力} = \frac{\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \div C_{\text{pr}} \div T \times f \times 10^6$$

(U/gprot)

**血清血浆样本丙酮酸脱羧酶(PDC)活力计算公式:**

定义: 37℃ 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。

$$\text{PDC 活力} = \frac{\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \div T \times f \times 10^6$$

(U/L)

**注解:**

$\Delta A_{\text{测}}$ : 测定孔变化 OD 值  $A_1 - A_2$

$\Delta A_{\text{空白}}$ : 空白孔变化 OD 值  $A_1 - A_2$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$

$d$ : 酶标板光径, 0.6 cm

$C_{\text{pr}}$ : 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

$10^6$ :  $1 \text{ mol} = 10^6 \mu\text{mol}$

## 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 %		

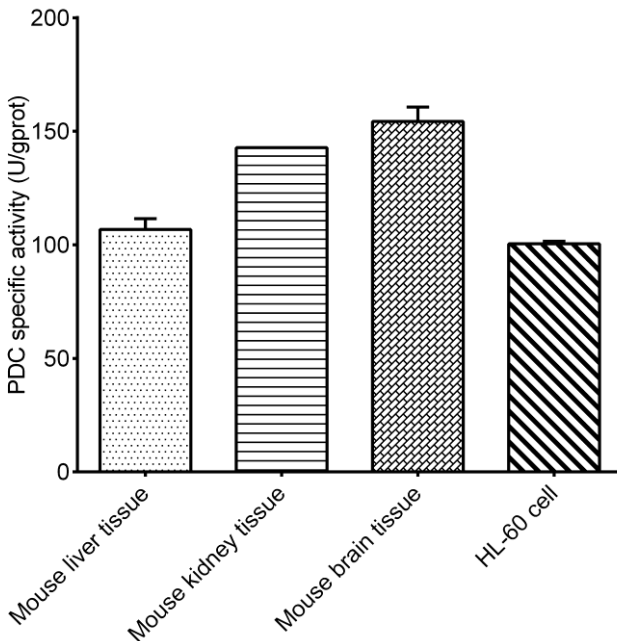
## 附录 2 实例分析

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  $\mu\text{L}$ , 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:

$$\text{PDC 活力(U/gprot)} = ((0.674-0.448) - (1.054-1.053)) \div (6220 \times 0.6) \div 14.18 \times 50 \div 2 \times 10^6 = 106.29 \text{ U/gprot}$$

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  $\mu\text{L}$ )、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  $\mu\text{L}$ )、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  $\mu\text{L}$ )、HL-60 细胞( $1 \times 10^6$  个细胞, 稀释 3 倍, 加样量为 20  $\mu\text{L}$ ) 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。





