（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-K650-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®丙酮酸脱氢酶 (PDH) 比色法测试盒

Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 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、尿液、动物组织及细胞样本中丙酮酸脱氢酶(PDH)的活力。

检测原理

丙酮酸脱氢酶（Pyruvate dehydrogenase，PDH）催化丙酮酸氧化脱羧生成乙酰 CoA，在细胞线粒体呼吸链代谢中起着重要作用，还与癌症基因的衰老有关。丙酮酸在 CoA 的作用下可被 PDH 进行催化脱羧，可将 NAD^+还原成 NADH，NADH 在电子传递体的作用下与显色剂反应生成有色物质，该物质在 450 nm 处有最大吸收，通过计算单位时间内的变化值可判断 PDH 活性大小。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，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(Size) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×2 瓶	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	40 mL×1 瓶	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 A (Substrate A)	粉剂×2 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	粉剂×2 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	6 mL×1 瓶	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37 ℃)、匀浆机、低温离心机

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液配制：

取一支试剂三，加入 0.5 mL 双蒸水溶解，置于冰盒上避光待用，未用完的工作液-20 ℃ 避光保存三天，避免反复冻融。

③ 试剂二工作液配制：

将试剂二与试剂三工作液按照 100：1 体积比进行配制，按需配制，配制好的工作液当天使用完毕。

④ 试剂四工作液配制：

取一支试剂四，加入 1.6 mL 双蒸水混匀溶解，置于冰盒上待用，未用完部分-20 ℃ 避光保存一周。

⑤ 0.5 mmol/L 标准品配制：

取一支试剂六，加入 1 mL 双蒸水溶解混匀，置于冰盒上待用，-20 ℃ 避光保存一周。

⑥ 不同浓度标准品稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.05**	**0.10**	**0.20**	**0.25**	**0.30**	**0.40**	**0.50**
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	20	40	80	100	120	160	200
双蒸水(μL)	200	180	160	120	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：组织处理的匀浆介质为试剂一，若离心（12000 ×g 离心10 min）后上清液浑浊，可重复将上清离心一次，取上清待用，保留部分上清用于蛋白测定。

细胞样本：取1×10^6细胞加入200 μL试剂一进行匀浆，12000 ×g 离心10 min，取上清待用，保留部分上清用于蛋白测定。

血清(浆)等液体样本：直接测定(若样本浑浊，可12000 ×g离心10 min后使用)。

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：0.28-168.91 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%大鼠肝组织	2-3	10%大鼠肾组织	不稀释
10%大鼠心组织	不稀释	10%大鼠脑组织	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	10%小鼠肝组织	2-3
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
1×10^6 HL-60	不稀释	大鼠血清	不稀释
大鼠血浆	不稀释	人尿液	不稀释

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品加入到相应标准孔中；
对照孔和测定孔：取 20 μL 待测样本加入到相应对照孔和测定孔中；

② 向步骤①各孔加入 140 μL 试剂二工作液；

③ 向步骤②标准孔和测定孔加入 20 μL 试剂四工作液，向对照孔加入 20 μL 双蒸水；

④ 向步骤③的各孔加入 20 μL 试剂五，酶标仪 450 nm 测定各孔 20 s 时的 OD 值 A_1 和 3 min 20 s 时的 OD 值 A_2，变化值 $\Delta A=A_2-A_1$，按照 A_2 值绘制标准曲线。

操作表

	标准孔	对照孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	20		
样本(μL)		20	20
试剂二工作液(μL)	140	140	140
试剂四工作液(μL)	20		20
双蒸水(μL)		20	
试剂五(μL)	20	20	20
酶标仪 450 nm 测定各孔 20 s 时的 OD 值 A_1 和 3 min 20 s 时的 OD 值 A_2，变化值 $\Delta A=A_2-A_1$，标准曲线按照 A_2 值绘制标准曲线。			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，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

标准品拟合曲线：y = ax + b

① 组织和细胞样本中丙酮酸脱氢酶(PDH)酶活计算公式

定义：37℃条件下，每克组织蛋白每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的 PDH 酶活定义为一个酶活力单位

$$\text{PDH 活力 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A_{测} - \Delta A_{对}) - b}{a} \div C_{pr} \div T \times f \times 1000^*$$

② 血清血浆中丙酮酸脱氢酶(PDH)酶活计算公式

定义：37℃条件下，每升血清/血浆样本每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的 PDH 酶活定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDH 活力 (U/L)} = \frac{(\Delta A_{测} - \Delta A_{对}) - b}{a} \div T \times f \times 1000^*$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值，标准品只用 A_2 值进行计算)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

$\Delta A_{测}$：测定孔变化值，$A_2 - A_1$

$\Delta A_{对}$：对照孔变化值，$A_2 - A_1$

T：反应时间，3 min

C_{pr}：组织或细胞样本蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

1000*：1 mmol = 1000 μmol

附录 1 关键数据

1. 技术参数

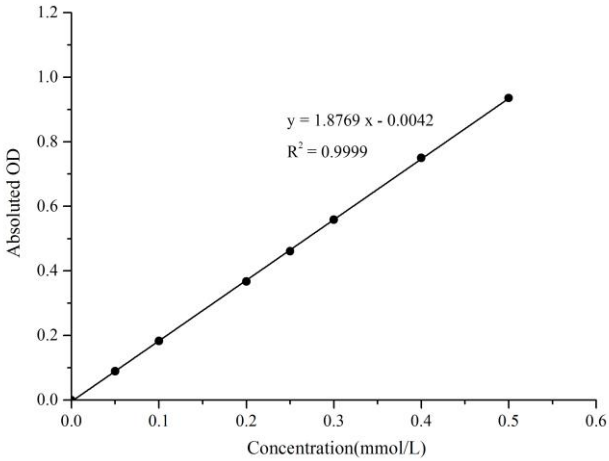
检测范围	0.28-168.91 U/L	**平均批间差**	10.0 %
灵敏度	0.28 U /L	**平均批内差**	2.0 %
平均回收率	95 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，各孔OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0.0**	**0.05**	**0.1**	**0.2**	**0.25**	**0.3**	**0.4**	**0.5**
OD 值	0.057	0.147	0.243	0.427	0.522	0.617	0.810	0.993
	0.058	0.147	0.239	0.422	0.515	0.615	0.805	0.993
平均 OD 值	0.058	0.147	0.241	0.425	0.519	0.616	0.808	0.993
绝对 OD 值	0.000	0.090	0.184	0.367	0.461	0.559	0.750	0.936

② 绘制标曲(如下图)：



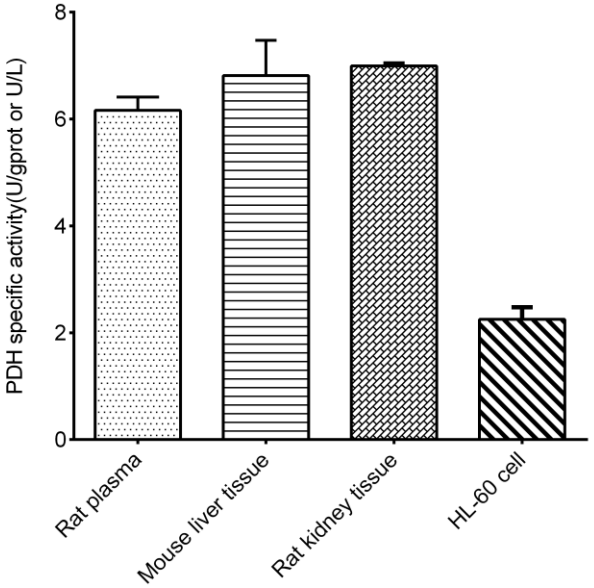
附录 2 实例分析

例如检测大鼠肾组织(数据仅供参考):

取 10%大鼠肾组织样本，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 1.8769 x - 0.0042，对照孔 A_1 值为 0.175，3 min 后检测 A_2 值为 0.177，$\Delta A_{对}$ =0.177 - 0.175 = 0.002；测定孔 A_1 值为 0.217，3 min 后检测 A_2 值为 0.602，$\Delta A_{测}$ = 0.602 - 0.217 = 0.385。10%大鼠肾组织匀浆蛋白浓度为 10.08 gprot/L 计算结果为：

$$\text{PDH 活力 (U/gprot)} = \frac{(0.385 - 0.002) + 0.0042}{1.8769} \div 10.08 \div 3 \times 1000 = 6.822\ \text{U/gprot}$$

按照说明书操作，测定大鼠肾组织(10%匀浆蛋白浓度为 10.08 gprot/L，加样量 20 μL)、小鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为 14.91 gprot/L，加样量 20 μL)、HL-60 细胞(匀浆蛋白浓度为 1.12 gprot/L，加样量 20 μL)、大鼠血浆(加样量 20 μL)中 PDH 活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测试结果偏低	样本稀释倍数较大	降低样本稀释倍数或增加样本匀浆浓度
	试剂二工作液配制时间过久	试剂二工作液在一周内使用完毕
标准孔测试值较小	标准品失效	标准品现配现用，未用完部分-20℃保存一周

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。