

(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	96 孔×1 块	无要求
	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 ($12000 \times g$ 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, $12000 \times g$ 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 $12000 \times g$ 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: 25°C 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

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

② 血清血浆中丙酮酸脱氢酶(PDH)酶活计算公式

定义: 25°C 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。

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

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

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

$\Delta A_{\text{对}}$: 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

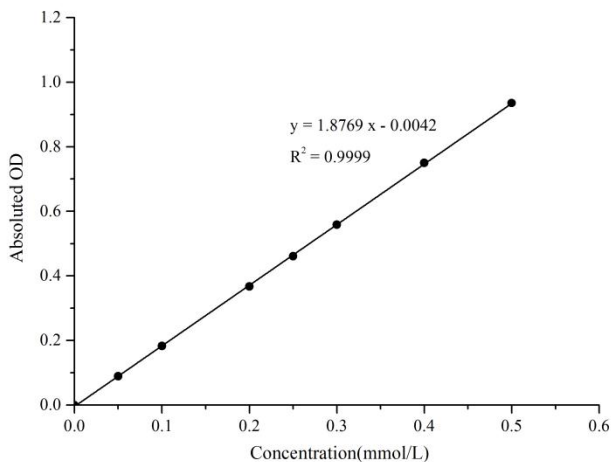
检测范围	0.28-168.91 U/L	平均批间差	10.0 %
灵敏度	0.28 U /L	平均批内差	2.0 %
平均回收率	95 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μ L，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)：



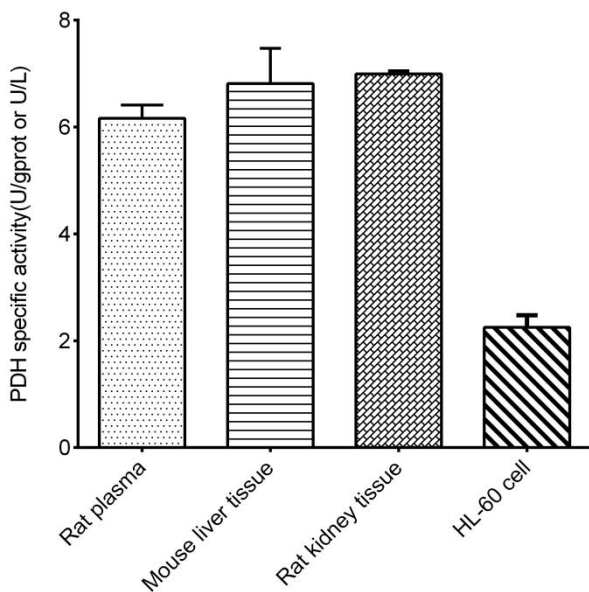
附录 2 实例分析

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

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

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。

