

丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶比色法)

产品简介：

丙酮酸(Pyruvic acid, PA)又称 2-氧代丙酸，是参与整个生物体基本代谢的中间产物之一，可通过乙酰辅酶 A 和三羧酸循环实现体内糖、脂肪和氨基酸间的互相转化，丙酮酸在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用，丙酮酸和乳酸是糖无氧代谢的产物，科研工作者常将二者一起研究，并用二者的比值推算循环衰竭的程度。丙酮酸检测可采用乳酸脱氢酶催化法、二硝基苯肼法等，二硝基苯肼法是比较古老的方法，生成有色物质，易于观察，但易受α-酮酸的干扰，特异性差，操作烦琐，目前首选方法是乳酸脱氢酶催化法。

Yuanye 丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶比色法)其检测原理是在 NADH 存在条件下，乳酸脱氢酶(LDH)催化丙酮酸氧化，生成乳酸和 NAD⁺，在弱碱性条件下平衡偏向丙酮酸氧化为乳酸的方向驱动反应，通过分光光度计或自动分析仪测定 340nm 处 NADH 吸光度的下降速率，计算出丙酮酸含量，可用于检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清等样品中内源性的丙酮酸含量。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称 \ 编号		R22024 60T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准		22mg	RT
试剂(B): 丙酮酸标准稀释液		5ml	RT
试剂(C):	C1: PA Assay Buffer	100ml	RT
PA 显色液	C2: NADH	2 支	-20℃ 避光
试剂(D): LDH Solution		1.6ml	-20℃ 避光
使用说明书		1 份	

自备材料：

- 1、蒸馏水
- 2、水浴锅或恒温箱、石英比色杯、紫外分光光度计或自动分析仪、离心管或小试管

操作步骤(仅供参考)：

- 1、准备样品：
 - ①血浆、血清、尿液及其他体液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，尿液通常也可以直接用于测定，-20℃冻存。
 - ②细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如果有必要需进行适当匀浆，低速离心取上清，-20℃冻存，用于 PA 的检测。
 - ③高浓度样品：如果样品中含有较高浓度的 PA，可以使用原有的裂解液或 PBS 等进行

稀释，如鸡血清、血浆可稀释 5 ~ 10 倍后检测。

- 2、配制标准品工作液：取丙酮酸标准 1 支，准确加入丙酮酸标准稀释液 1ml，充分混匀，即配制成丙酮酸标准(100mmol/L)，4℃保存备用。临用前，按丙酮酸标准(100mmol/L)：丙酮酸标准稀释液=1：199 的比例混合，即为标准品工作液-丙酮酸标准(0.5mmol/L)；4℃避光保存，24h 有效。
- 3、配制 PA 显色液：取一支 NADH 加蒸馏水 1ml 溶解，-20℃保存，7d 有效。临用前，按 PA Assay Buffer：NADH 水溶液=50：1 的比例混合，即为 PA 显色液，4℃保存，36h 有效。
- 4、配制 PA-LDH 显色液(仅适用于自动分析仪)：取配制好的 PA 显色液 10ml 与 LDH Solution 0.04ml 混匀，即为 PA-LDH 显色液；4℃避光保存，24h 有效。
- 5、分光光度计测定：按照下表设置空白管、标准管、测定管，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品中的 PA 浓度过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(ml)	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	0.15	—	—
待测样品(血清、血浆、体液等)	—	—	0.15
丙酮酸标准(0.5mmol/L)	—	0.15	—
PA 显色液	1.6	1.6	1.6
充分混匀，蒸馏水调零，于 340nm 处读取空白管、标准管、测定管的吸光度，分别为 $A_{\text{空白1}}$ 、 $A_{\text{标准1}}$ 、 $A_{\text{测定1}}$ 。			
LDH Solution	0.025	0.025	0.025

室温孵育 1min，紫外分光光度计立即测定 340nm 空白管、标准管、测定管的吸光度，分别为 $A_{\text{空白2}}$ 、 $A_{\text{标准2}}$ 、 $A_{\text{测定2}}$ ，此后每隔 1min 读 1 次吸光度，直至读数稳定，分别为 $A_{\text{空白x}}$ 、 $A_{\text{标准x}}$ 、 $A_{\text{测定x}}$ 。

- 6、自动分析仪测定：样品中的 PA 浓度过高，可以减少样品用量或稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管；根据实验室的自动分析仪性能设置参数如下供参考：

温度	37℃	延迟时间	30s
pH	7.4	检测时间	120s
波长	340nm		
待测样品/丙酮酸标准(0.5mmol/L)体积	25μl		
PA-LDH 显色液	275μl		

分别检测待测样品管吸光度的下降速率($\Delta A_u/\text{min}$)和标准管吸光度的下降速率($\Delta A_s/\text{min}$)。

计算:

分光光度计比色计算公式:

$$\text{丙酮酸}(\text{mmol/L}) = \{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) / (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})\} \times 0.5 \times D$$

也可根据 NADH 毫摩尔吸光度计算:

$$\text{丙酮酸}(\text{mmol/L}) = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 1.7566 \times D / (6.22 \times 0.15)$$

$$\text{式中: } \Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定x}}$$

$$\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白x}}$$

$$\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准1}} - A_{\text{标准x}}$$

D=稀释倍数

1.775=反应液的总体积(ml)

6.22=NADH 毫摩尔吸光度

0.15=待测样品体积(ml)

$$\text{换算公式: 丙酮酸}(\text{mg/dl}) = \text{丙酮酸}(\text{mmol/L}) \times 8.8$$

自动分析仪计算公式:

血清、血浆、尿液、脑脊液丙酮酸(mmol/L)

$$= \{(\Delta A_u / \text{min}) / (\Delta A_s / \text{min})\} \times 0.5$$

组织丙酮酸(mmol/g)

$$= \{(\Delta A_u / \text{min}) / (\Delta A_s / \text{min})\} \times \{0.5 / \text{待测样品蛋白浓度}(\text{g/L})\}$$

参考区间:

空腹静脉、动脉血	<0.1mmol/L
----------	------------

注意事项:

- 1、本法适用于自动分析仪，分别测定管和标准管的吸光度升高速率，计算乳酸的浓度，如果采用自动分析仪，该 50T 试剂盒可检测约 300 次。
- 2、配制好的 PA 显色液，4℃保存，36h 有效。
- 3、配制好的 PA-LDH 显色液，4℃保存，24h 有效。
- 4、如果没有分光光度计，也可以使用酶标仪测定，我们推荐采用分光光度计，以使操作系统误差减小到最少；一次不应检测过多样品，以免因为时间误差而导致结果差异较大。
- 5、抗凝剂用肝素钠-氟化钠较好，抗凝血样品置于冰浴中送检，尽快分离出血浆等。
- 6、草酸抗凝剂对 LDH 有一定的抑制作用。
- 7、采用乳酸脱氢酶法检测全血丙酮酸时，一般不建议采用微板法，这是由于手工操作差异较大，尤其是该法对操作时间要求极其严格，操作难以标准化、统一化，检测结果不稳定。
- 8、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。