丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶微板法)

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(乳酸脱氢酶微板法)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，通过酶标仪测定 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：

编号 / 名称		R22025 120T	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)：PA 显色液	C1: PA Assay Buffer	33ml	RT
	C2: NADH	1 支	-20℃ 避光
试剂(D): LDH Solution		0.48ml	-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、96 孔 UV 板、全波长酶标仪或自动分析仪、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 9.6ml 与 LDH Solution 0.15ml 混匀，即为 PA-LDH 显色液；4℃避光保存，24h 有效。

5、酶标仪测定：按照下表设置空白孔、标准孔、测定孔，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孔。

加入物(μl)	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水	24	—	—
待测样品(血清、血浆、体液等)	—	—	24
丙酮酸标准(0.5mmol/L)	—	24	—
PA 显色液	256	256	256
充分混匀，蒸馏水调零，于 340nm 处读取空白孔、标准孔、测定孔的吸光度，分别记为 $A_{空白1}$、$A_{标准1}$、$A_{测定1}$。			
LDH Solution	4	4	4

室温孵育 1min，酶标仪立即测定 340nm 吸光度，分别为 $A_{空白2}$、$A_{标准2}$、$A_{测定2}$，此后每隔 1min 读 1 次吸光度，直至读数稳定，分别为 $A_{空白x}$、$A_{标准x}$、$A_{测定x}$。

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(ΔA_u/min)和标准管吸光度的下降速率(ΔA_s/min)。

计算：

酶标仪比色计算公式：

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

也可根据 NADH 毫摩尔吸光度计算：

丙酮酸(mmol/L)=($\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}$)×0.284×D/(6.22×0.024)

式中：$\Delta A_{测定}=A_{测定1}-A_{测定x}$

$\Delta A_{空白}=A_{空白1}-A_{空白x}$

$\Delta A_{标准}=A_{标准1}-A_{标准x}$

D=稀释倍数

0.284=反应液的总体积(ml)

6.22=NADH 毫摩尔吸光度

0.024=待测样品体积(ml)

换算公式：丙酮酸(mg/dl)=丙酮酸(mmol/L)×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)

={(ΔA_u/min)/(ΔA_s/min)}×0.5

组织丙酮酸(mmol/g)

={(ΔA_u/min)/(ΔA_s/min)}×{(0.5/待测样品蛋白浓度(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 120T 试剂盒可检测约 100 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、如果没有酶标仪也可以使用分光光度计测定，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。