上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼比色法)

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，丙酮酸是糖无氧代谢的产物，科研工作者常将丙酮酸和乳酸一起研究，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或二硝基苯肼比色法。

源叶生物丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼比色法)检测原理是在酸性条件下，丙酮酸与二硝基苯肼反应，生成丙酮酸-二硝基苯腙复合物，后者经氧化呈棕红色，通过分光光度比色法测定 520nm 处吸光度，据此通过与标准曲线对比可以计算出 PA 水平，该试剂盒可用于检测植物、细胞或组织、血清等样品中内源性的丙酮酸含量，尤其适用植物样品丙酮酸含量的检测。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

组成：

编号 / 名称	R21659 50T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准(6mg/ml)	1ml	4℃ 避光
试剂(B): 组织匀浆液(3×)	2×100ml	RT 避光
试剂(C): 苯肼显色液	30ml	4℃ 避光
试剂(D): PA Assay Buffer (1.5×)	100ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料：

1、离心管或小试管

2、蒸馏水

3、分光光度计、比色杯

操作步骤(仅供参考)：

1、配制组织匀浆液(1×)：取 10ml 组织匀浆液(3×)加入 20ml 蒸馏水即成。

2、配制 PA Assay Buffer (1×)：取 10ml PA Assay Buffer (1.5×)加入 5ml 蒸馏水即成。

3、准备样品：

①血清、尿液及其他体液样品：血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定，尿液通常也可以直接用于测定，-20℃冻存。

②组织样品：称取 2g 组织样品置于匀浆器中，再加入 2ml 组织匀浆液(1×)仔细研磨，振摇提取，静置 30min，取上清液 4000rpm 离心 10min，取上清液，用组织匀浆液(1×)定容至 4ml，-20℃冻存，用于 PA 的检测。

③植物材料：称取 2g 植物材料置于匀浆器中，再加入 2ml 组织匀浆液(1×)仔细研磨，振摇提取，静置 30min，取上清液 4000rpm 离心 10min，取上清液，用组织匀浆液(1×)定容至 4ml，-20℃冻存，用于 PA 的检测。

④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，如鸡血清可稀释 5～10 倍后检测。

4、配制标准品工作液：如果检测血清、尿液等样品，按取丙酮酸标准(6mg/ml)：蒸馏水=1：99 的比例配制，使浓度达到 60μg/ml；如果检测组织样品，按丙酮酸标准(6mg/ml)：组织匀浆液(1×)=1：99 的比例配制，使浓度达到 60μg/ml。

a、检测血清、尿液等样品时，按下表操作：

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6
丙酮酸标准(60μg/ml,蒸馏水配制)	0.03	0.07	0.1	0.2	0.4	0.6
蒸馏水	0.87	0.98	0.9	0.8	0.6	0.4
丙酮酸浓度(μg/ml)	2	4	6	12	24	36

b、检测组织样品时，用 96 孔板按下表操作：

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6
丙酮酸标准(60μg/m,匀浆液配制)	0.03	0.07	0.1	0.2	0.4	0.6
组织匀浆液(1×)	0.87	0.98	0.9	0.8	0.6	0.4
丙酮酸浓度(μg/ml)	2	4	6	12	24	36

5、PA 加样：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。

a、检测血清、尿液等样品时，按下表操作：

加入物(ml)	空白管(血清等)	标准管	测定管
蒸馏水	0.9	—	—
蒸馏水稀释后的各丙酮酸标准	—	0.9	—
待测样品	—	—	0.9
苯肼显色液	0.3	0.3	0.3
充分混匀			
PA Assay Buffer	1.5	1.5	1.5

b、检测组织样品时，按下表操作：

加入物(ml)	空白管(组织等)	标准管	测定管
组织匀浆液(1×)	0.9	—	—
匀浆液稀释后的各丙酮酸标准	—	0.9	—
待测样品	—	—	0.9
苯肼显色液	0.3	0.3	0.3
充分混匀			
PA Assay Buffer	1.5	1.5	1.5

6、PA 检测：混匀静置 10min，其中空白管呈淡黄色，标准孔依次呈不同程度的棕红色。用分光光度计 520nm，以空白管调零，比色杯光径 1cm，读取标准管、测定管的吸光度(记为 $A_{标准}$、$A_{测定}$)。

计算：

以各丙酮酸标准浓度(1~6 号)为横坐标，以对应各丙酮酸标准 $A_{标准}$为纵坐标，绘制丙酮酸标准曲线，血清、尿液等的丙酮酸含量直接根据标准曲线求得。

组织丙酮酸(μg/g)=A×N/m

血清丙酮酸(μg/ml)=A×N

式中：A=通过标准曲线计算样品的丙酮酸浓度(μg/ml)

N=稀释倍数

m=样品的质量(g)数

注意事项：

1、所加试剂顺序不可颠倒，先加丙酮酸标准液或待测液，再加组织匀浆液(1×)，最后加 PA Assay Buffer(1×)。

2、配制的丙酮酸标准(60μg/m)应 4℃避光保存，24h 有效。

3、组织匀浆液有腐蚀性，应小心操作。

4、健康成年人空腹静脉全血丙酮酸含量为 3~9μg/ml。

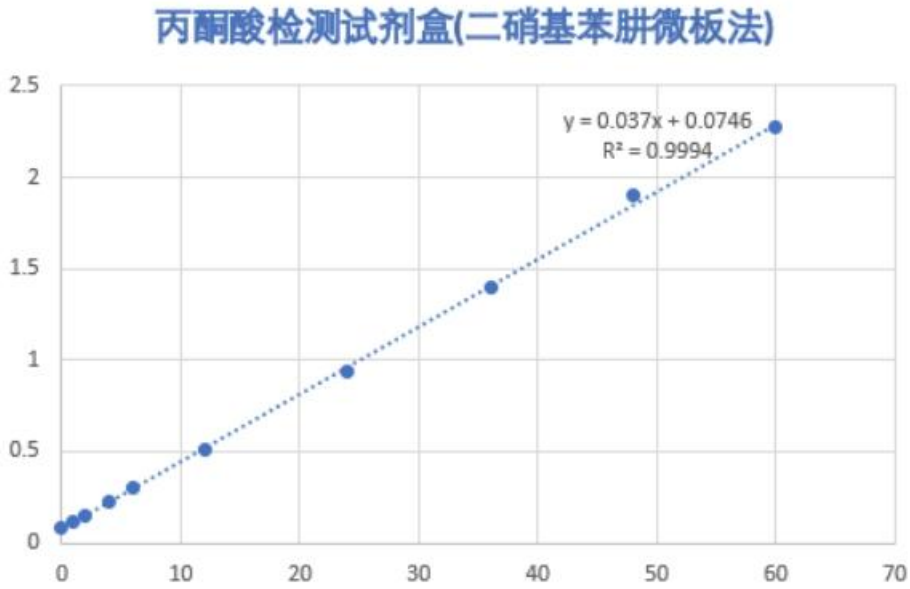
5、如果没有分光光度计，也可以使用酶标仪测定，检测样品量会相应增加。

6、标准曲线的各点应分布均匀，范围适中。

7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6 个月有效。4℃运输，4℃保存。

附录：参考标准曲线范围：源叶生物在室温条件下通过酶标仪 520nm 测定丙酮酸标准在 1~60μg/ml 时，其吸光度多在 0.10~2.40 之间。根据源叶生物测定丙酮酸标准在 1、2、4、6、12、24、36、48、60μg/ml 时的吸光度，作出标准曲线如下：



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，参考值范围会有波动，该值仅供参考，对于要求精确计算丙酮酸含量的，可以采用多点标准曲线重复测定；根据源叶生物测定经验显示，标准品浓度在 1μg/ml 以下，标准品浓度在 60μg/ml 以上，标准曲线会有偏差。