

丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

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。

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	规格	保存条件
丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶比色法)	60T	4℃避光
试剂(A):丙酮酸标准(25mmol/L)	1ml	4℃避光
试剂(B):丙酮酸标准稀释液	5ml	RT
试剂(C): C1:PAAssayBuffer	100ml	4℃避光
PA 显色液 C2:NADH	2 支	-20℃避光
临用前，按 C1:C2=50ml:1 支的比例混合，即为 PA 显色液。		
试剂(D):LDH Solution	0.42ml	-20℃避光
使用说明书	1 份	
有效期	6 个月	

自备材料：

- 1、离心管或小试管
- 2、蒸馏水
- 3、水浴锅或恒温箱

4、比色杯

5、分光光度计或自动分析仪

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°C 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°C 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(25mmol/L) 0.01ml 溶解于 0.49ml 丙酮酸标准稀释液, 使浓度达到 0.5mmol/L , 即为标准品工作液-丙酮酸标准(0.5mmol/L); 4°C 避光保存, 24h 有效。

3、配制 PA-LDH 显色液(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°C 避光保存, 24h 有效。

4、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检测, 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-LDH 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 空白 1、A 标准 1、A 测定 1。			
LDH Solution	0.0066	0.0066	0.0066

室温孵育 1min , 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 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。

5、自动分析仪测定: 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检测, 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, 下列参数仅供参考:

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

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:

丙酮酸(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:

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

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

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

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

D=稀释倍数

1.7566=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)

换算公式: 丙酮酸(mg/dl)=丙酮酸(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。