

## 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 $\alpha$ -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。

Leagene 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  $\text{NAD}^+$ ,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	TC0755 60T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准(25mmol/L)		1ml	4°C 避光
试剂(B): 丙酮酸标准稀释液		5ml	RT
试剂(C):	C1: PA Assay Buffer	100ml	4°C
PA 显色液	C2: NADH	2 支	-20°C 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°C 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、比色杯、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°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℃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℃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℃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-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 $A_{\text{空白}1}$ 、 $A_{\text{标准}1}$ 、 $A_{\text{测定}1}$ 。			
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  $A_{\text{空白}2}$ 、 $A_{\text{标准}2}$ 、 $A_{\text{测定}2}$ ，此后每隔 1min 读 1 次吸光度，直至读数稳定，分别为  $A_{\text{空白}x}$ 、 $A_{\text{标准}x}$ 、 $A_{\text{测定}x}$ 。

- 5、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℃
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	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:

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

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

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

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

D = 稀释倍数

1.7566 = 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) × 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)

$$= \{(\Delta A_0 / \text{min}) / (\Delta A_s / \text{min})\} \times 0.5$$

组织丙酮酸(mmol/g)

$$= \{(\Delta A_0 / \text{min}) / (\Delta A_s / \text{min})\} \times \{(0.5 / \text{待测样品蛋白浓度}(\text{g/L}))\}$$

**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°C 保存, 36h 有效。
- 3、配制好的 PA-LDH 显色液, 4°C 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。

**相关产品：**

产品编号	产品名称
CS0001	ACK 红细胞裂解液(ACK Lysis Buffer)
DC0032	Masson 三色染色液
DP0013	GUS 染色液(即用型)
DZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
NR0001	DEPC 处理水(0.1%)
PS0013	RIPA 裂解液(强)
TC0711	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 微板法)
TC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)
TE0740	过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(钼酸铵微板法)