

丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶微板法)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(Pyruvicacid, 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：

名称	规格	保存条件
丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶微板法)	120T	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	1ml	RT
试剂(C): C1:PAAssayBuffer	25ml	4℃避光
PA 显色液 PA 显色液	2 支	-20℃避光
临用前，按 C1:C2=12.5ml:1 支的比例混合，即为 PA 显色液。		
试剂(D):LDHSolution	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、96 孔板

5、酶标仪或自动分析仪

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 0.12ml 混匀, 即为 PA-LDH 显色液; 4°C 避光保存, 24h 有效。

4、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	20	—	—
待测样品(血清、血浆、体液等)	—	—	20
丙酮酸标准(0.5mmol/L)	—	20	—
PA-LDH 显色液	196	196	196
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	3.3	3.3	3.3

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。

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适当稀释后再进行测定, 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, 下列参数仅供参考:

温度	37°C
----	----------------------

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 显色液	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:

酶标仪比色计算公式:

丙酮酸(mmol/L)={(ΔA 测定 - ΔA 空白)/(ΔA 标准 - ΔA 空白)} \times 0.5 也可根据 NADH 毫摩尔吸

光度计算:

丙酮酸(mmol/L)=(ΔA 测定 - ΔA 空白) \times (0.02193/6.22) \times (D/0.02)

式中: ΔA 测定=A 测定 1-A 测定 x

ΔA 空白=A 空白 1-A 空白 x

ΔA 标准=A 标准 1-A 标准 x

D=稀释倍数

0.2193=反应液的总体积(ml)

6.22=NADH 毫摩尔吸光度

0.02=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/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。