

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 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 | | 编号 | Storage |
|--|---------------------|------------------|----------|
| | | ADS085TC0 60T | |
| 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): PA 显色液 | C1: PA Assay Buffer | 100ml | 4°C |
| | 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 $A_{\text{空白}1}$ 、 $A_{\text{标准}1}$ 、 $A_{\text{测定}1}$ 。 | | | |
| 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($\Delta A_{\text{p}}/\text{min}$)和标准管吸光度的下降速率($\Delta A_{\text{s}}/\text{min}$)。

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)

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

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。
- 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。低温运输，按要求保存。