

全血丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶微板法)

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。

全血丙酮酸检测试剂盒(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, 可用于检测全血血浆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	ADS086TC0 50T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准(100mmol/L)		1ml	4°C 避光
试剂(B): 蛋白沉淀剂		3 瓶	RT 避光
试剂(C): NADH Solution	C1: NADH	2 支	-20°C 避光
	C2: NADH Buffer	3ml	RT
	C3: PA Assay Buffer	10ml	RT
按 C1:C2=1 支:1ml 的比例充分混合, 即为 C1C2 液, 4°C避光保存 48h 有效。 临用前, 按C1C2 液: PA Assay Buffer=3: 50 的比例混合, 即为 NADH Solution, 即配即用。			
试剂(D): LDH Solution		0.3ml	-20°C 避光
使用说明书		1 份	

自备材料

1、蒸馏水、96 孔板、离心管或小试管、酶标仪

操作步骤(仅供参考)

1、配制蛋白沉淀工作液: 取 1 瓶蛋白沉淀剂, 直接加入蒸馏水至 100ml, 充分混匀, 即为

- 蛋白沉淀工作液；4℃避光保存，1 周有效，该试剂有一定腐蚀性，请小心操作。
- 2、配制空白对照液：取配制好的蛋白沉淀工作液 1ml 加入 0.67ml 蒸馏水(即按 3:2 比例配制)，混匀，即为空白对照液；4℃避光保存，1 周有效。
 - 3、配制标准品工作液：取适量的丙酮酸标准(100mmol/L)，按 0.01ml 丙酮酸标准(100mmol/L)溶解于 19.9ml 空白对照液的比例稀释标准品，使浓度达到 0.05mmol/L，即为标准品工作液-丙酮酸标准(0.05mmol/L)；4℃避光保存，24h 有效。
 - 4、制备无蛋白上清液：抽血前，取试管或离心管编号，分别称重(W_t)并记录，加入 6ml 蛋白沉淀工作液，再次分别称重(W_m)并记录，冰浴或 4℃保存备用。在空腹和休息状态下抽血，不用止血带，不可用力握拳，如果使用止血带，应在穿刺后除去止血带至少等待 2min 后再抽血；最好用肝素化的注射器抽血，抽取血液后立即注入预先称量的含有蛋白沉淀工作液(预冷至 4℃)的试管或离心管中，每管 2ml。(如果用血浆测定，每毫升血中用 10mg 氟化钠和 2mg 草酸钾抗凝，立即冷却样本，在 15min 内离心。)颠倒混匀 3 次，不可产生气泡，待试管或离心管的温度与室温一致时，再称重(W_b)并记录。静置 20min 以上，4000g 离心 15min，取上清液(即无蛋白上清液)待用，上清液应澄清，如果浑浊，转移上清液至干净试管或离心管后，再次离心。
 - 5、PA 加样：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(μ l)	空白孔	标准孔	测定孔
空白对照液	167	—	—
丙酮酸标准(0.05mmol/L)	—	167	—
无蛋白上清液	—	—	167
NADH Solution	89	89	89
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，分别为 $A_{\text{空白1}}$ 、 $A_{\text{标准1}}$ 、 $A_{\text{测定1}}$ 。			
LDH Solution	5	5	5

- 6、PA 检测：充分混匀，酶标仪检测 340nm 吸光度，室温孵育 2min 后再读取空白孔、标准孔、测定孔的吸光度，此后每隔 1min 读 1 次吸光度，直至读数稳定，分别为 $A_{\text{空白2}}$ 、 $A_{\text{标准2}}$ 、 $A_{\text{测定2}}$ 。

计算：全血丙酮酸(mmol/L) = $\{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) / (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})\} \times 0.05 \times D$
也可根据 NADH 毫摩尔吸光度计算：

$$\text{全血丙酮酸(mmol/L)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times (0.261/6.22) \times (D/0.167)$$

$$\text{式中：} \Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定2}}$$

$$\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}$$

$$\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准1}} - A_{\text{标准2}}$$

$$D = (W_b - W_t) / (W_b - W_m)$$

0.261 = 反应液的总体积(ml)

6.22 = NADH 毫摩尔吸光度

0.167 = 无蛋白上清液体积(ml)

换算公式：丙酮酸(mg/dl) = 丙酮酸(mmol/L) × 8.8

参考区间

空腹静脉血	0.03~0.1mmol/L(0.3~0.9mg/dl)
-------	------------------------------

注意事项

- 1、配制好的 NADH Solution, 4°C保存, 24h 有效。
- 2、血中丙酮酸极不稳定, 血液抽出后 1min 就见降低; 在蛋白沉淀液上清中的丙酮酸, 可 4°C稳定 8 天左右。
- 3、如果没有酶标仪也可以使用分光光度计测定, 但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。
- 4、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。
- 5、草酸抗凝剂对 LDH 有一定的抑制作用。
- 6、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, 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。
- 7、本法在 0~0.25mmol/L 范围内呈良好线性, 本法特异性和干扰特异性较高, 抗干扰能力强, α-酮丁酸会产生正干扰, α-酮戊二酸、β-羟丁酸、草酰乙酸、乙酰乙酸和异柠檬酸等均无干扰。
- 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。