

## 全血丙酮酸检测试剂盒(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。

全血丙酮酸检测试剂盒(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	ADS087TC0	Storage
			50T	
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		5ml	RT
	C3: PA Assay Buffer		30ml	RT
按 C1:C2=1 支:1.5ml 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			1.6ml	-20°C 避光
使用说明书				1 份

### 自备材料

- 1、蒸馏水、离心管或小试管、比色杯、分光光度计或自动分析仪

### 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 1ml 蛋白沉淀工作液加入 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 氯化钠和 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
空白对照液	1	—	—
丙酮酸标准(0.05mmol/L)	—	1	—
无蛋白上清液	—	—	1
NADH Solution	0.53	0.53	0.53
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	0.03	0.03	0.03

6、PA 检测：充分混匀，比色杯光径 1cm，分光光度计检测 340nm 吸光度，室温孵育 2min 后再读取空白管、标准管、测定管的吸光度，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：  
全血丙酮酸(mmol/L) =  $(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times (1.56/6.22) \times (D/1)$

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

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

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

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

1.56 = 反应液的总体积(ml)

6.22 = NADH 毫摩尔吸光

度 1 = 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 ~ 0.1 mmol/L (0.3 ~ 0.9 mg/dl)
-------	-------------------------------------

### 注意事项

- 1、配制好的 NADH Solution，4℃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℃稳定 8 天左右。
- 3、如果没有分光光度计，也可以使用酶标仪测定，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， $\alpha$ -酮丁酸会产生正干扰， $\alpha$ -酮戊二酸、 $\beta$ -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 个月有效。低温运输，按要求保。