

丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)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(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。丙酮酸是糖无氧代谢的产物，科研工作者常将丙酮酸和乳酸一起研究，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或二硝基苯肼比色法。

丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)检测原理是在酸性条件下，丙酮酸与二硝基苯肼反应，生成丙酮酸-二硝基苯肼复合物，后者经氧化呈棕红色，通过酶标仪测定 520nm 处吸光度，据此通过与标准曲线对比可以计算出 PA 水平。该试剂盒可用于检测植物、细胞或组织、血清等样品中内源性的丙酮酸含量，尤其适用植物样品丙酮酸含量的检测。该试剂盒仅用于科研领域，不宜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(二硝基苯肼微板法)	100T	4℃避光
试剂(A):丙酮酸标准(6mg/ml)	1ml	4℃避光
试剂(B):组织匀浆液(3×)	100ml	RT 避光
试剂(C):苯肼显色液 3ml	3ml	4℃避光
试剂(D):PAAssayBuffer(1.5×)	10ml	RT
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、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考)：

- 1、配制组织匀浆液(1×)：取 10ml 组织匀浆液(3×)加入 20ml 蒸馏水即成。
- 2、配制 PAAssayBuffer(1×)：取 10ml PAAssayBuffer(1.5×)加入 5ml 蒸馏水即成。

3、准备样品:

①血清、尿液及其他体液样品: 血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, 尿液通常也可以直接用于测定, -20°C 冻存。

②组织样品: 称取 1g 组织样品置于匀浆器中, 再加入 1ml 组织匀浆液(1×)仔细研磨, 振摇提取, 静置 30min, 取上清液 4000rpm 离心 10min, 取上清液, 用组织匀浆液(1×)定容至 2ml, -20°C 冻存, 用于 PA 的检测。

③植物材料: 称取 1g 植物材料置于匀浆器中, 再加入 1ml 组织匀浆液(1×)仔细研磨, 振摇提取, 静置 30min, 取上清液 4000rpm 离心 10min, 取上清液, 用组织匀浆液(1×)定容至 2ml, -20°C 冻存, 用于 PA 的检测。

④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, 如鸡血清可稀释 5~10 倍后检测。

4、配制标准品工作液: 如果检测血清、尿液等样品, 按取丙酮酸标准(6mg/ml): 蒸馏水=1: 99 的比例配制, 使浓度达到 $60\ \mu\text{g/ml}$; 如果检测组织样品, 按丙酮酸标准(6mg/ml): 组织匀浆液(1×)=1: 99 的比例配制, 使浓度达到 $60\ \mu\text{g/ml}$ 。a、检测血清、尿液等样品时, 用 96 孔板按下表操作:

5、

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6
丙酮酸标准($60\ \mu\text{g/ml}$, 蒸馏水配制)	2.5	5	7.5	15	30	45
蒸馏水	72.5	70	67.5	60	45	30
丙酮酸浓度($\mu\text{g/ml}$)	2	4	6	12	24	36

b、检测组织样品时, 用 96 孔板按下表操作:

加入物(μl)	1	2	3	4	5	6
丙酮酸标准($60\ \mu\text{g/ml}$, 蒸馏水配制)	2.5	5	7.5	15	30	45
组织匀浆液(1×)	72.5	70	67.5	60	45	30
丙酮酸浓度($\mu\text{g/ml}$)	2	4	6	12	24	36

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管。

a、检测血清、尿液等样品时, 用 96 孔板按下表操作:

加入物(μl)	空白孔(血清等)	标准孔	测定孔
蒸馏水	75	—	—
蒸馏水稀释后的各丙酮酸标准	—	75	—
待测样品	—	—	75

苯肼显色液	25	25	25
充分混匀			
PAAssayBuffer	125	125	125

b、检测组织样品时，用 96 孔板按下表操作：

加入物(ml)	空白孔(组织等)	标准孔	测定孔
组织匀浆液(1×)	75	—	—
蒸馏水稀释后的各丙酮酸标准	—	75	—
待测样品	—	—	75
苯肼显色液	25	25	25
充分混匀			
PAAssayBuffer	125	125	125

6、PA 测定：混匀静置 10min，其中空白孔呈无色或淡黄色，标准孔依次呈不同程度的棕红色。以空白孔调零，酶标仪 520nm 读取标准孔、测定孔的吸光度值(记为 A 标准、A 测定)。

计算：

以各丙酮酸标准浓度(1~6 号)为横坐标，以对应各丙酮酸标准 A 标准为纵坐标，绘制丙酮酸标准曲线，血清、尿液等的丙酮酸含量直接根据标准曲线求得。

$$\text{组织丙酮酸}(\mu\text{g/g}) = A \times N / m$$

$$\text{血清丙酮酸}(\mu\text{g/ml}) = A \times N$$

式中：A=通过标准曲线计算样品的丙酮酸浓度(μg/ml)

N=稀释倍数

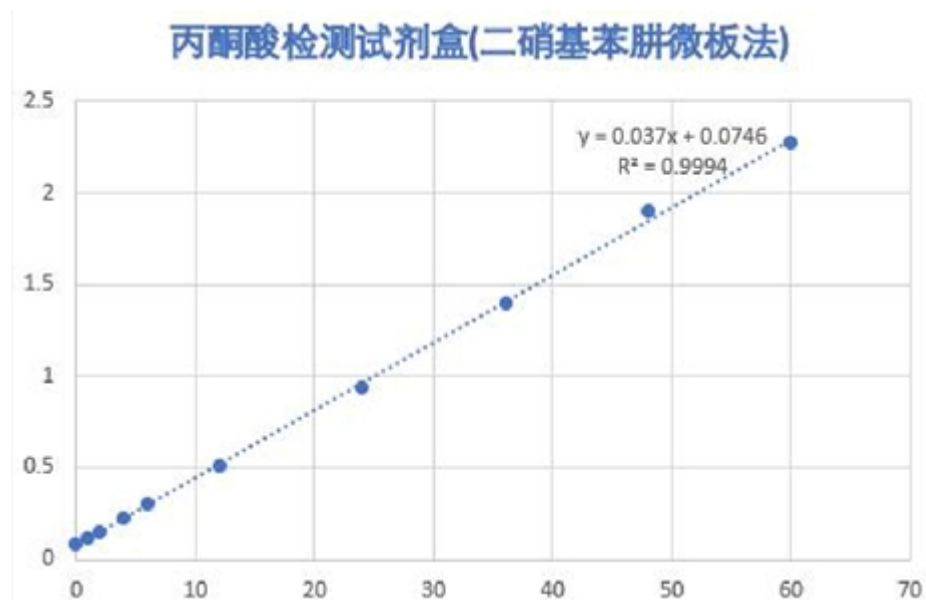
m=样品的质量(g)

注意事项：

- 1、所加试剂顺序不可颠倒，先加丙酮酸标准液或待测液，再加组织匀浆液(1×)，最后加 PAAssayBuffer(1×)。
- 2、配制的丙酮酸标准(60 μg/m)应 4℃ 避光保存，24h 有效。
- 3、组织匀浆液有腐蚀性，应小心操作。
- 4、健康成年人空腹静脉全血丙酮酸含量为 3~9 μg/ml。
- 5、如果没有酶标仪，也可以使用分光光度计测定，检测样品量会相应减少。
- 6、标准曲线的各点应分布均匀，范围适中。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录：参考标准曲线范围：在室温条件下通过酶标仪 520nm 测定丙酮酸标准在 1~60 μg/ml 时，其吸光度多在 0.10~2.40 之间。根据测定丙酮酸标准在 1、2、4、6、12、24、36、48、

60 $\mu\text{g/ml}$ 时的吸光度，作出标准曲线如下：



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，参考值范围会有波动，该值仅供参考，对于要求精确计算丙酮酸含量的，可以采用多点标准曲线重复测定；根据测定经验显示，标准品浓度在 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下，标准品浓度在 $60 \mu\text{g/ml}$ 以上，标准曲线会有偏差。