

全血丙酮酸检测试剂盒(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。

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		规格	保存条件
全血丙酮酸检测试剂盒(乳酸脱氢酶微板法)		50T	4℃避光
试剂(A):丙酮酸标准(100mmol/L)		1ml	4℃避光
试剂(B):蛋白沉淀剂		3 瓶	RT 避光
试剂(C):	C1:NADH	2 支	-20℃避光
NADHSolution	C2:NADHBuffer	3ml	RT
	C3:PAAssayBuffer	10ml	RT
按 C1:C2=1 支:1ml 的比例充分混合，即为 C1C2 液，4℃避光保存 48h 有效。 临用前，按 C1C2 液：PAAssayBuffer=3：50 的比例混合，即为 NADHSolution，即配即用。			
试剂(D):LDHSolution		0.3ml	-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、96 孔板
- 4、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(Wt)并记录，加入 6ml 蛋白沉淀工作液，再次分别称重(Wm)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(Wb)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。

酶标仪、全自动生化分析仪 Glu 测定			
加入物(μl)	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
NADHSolution	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 空白 1、A 标准 1、A 测定 1。 0			
LDHSolution	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 空白 2、A 标准 2、A 测定 2。

计算：全血丙酮酸(mmol/L)={(ΔA 测定-ΔA 空白)/(ΔA 标准-ΔA 空白)}×0.05×D

也可根据 NADH 毫摩尔吸光度计算：

全血丙酮酸(mmol/L)=(ΔA 测定-ΔA 空白)×(0.261/6.22)×(D/0.167)

式中：ΔA 测定=A 测定 1-A 测定 2

ΔA 空白=A 空白 1-A 空白 2

ΔA 标准=A 标准 1-A 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℃ 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。

