

## 丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)

### 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 \ 编号                       | ADS082TC0<br>100T | Storage |
|-------------------------------|-------------------|---------|
| 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               | 4℃ 避光   |
| 试剂(D): PA Assay Buffer (1.5×) | 10ml              | RT      |
| 使用说明书                         | 1 份               |         |

### 自备材料

- 1、蒸馏水
- 2、酶标仪、96 孔板、离心管或小试管

### 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 PA Assay Buffer (1×): 取 10ml PA Assay Buffer (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℃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℃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℃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 60μg/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 60μg/ml。

a、检测血清、尿液等样品时，用 96 孔板按下表操作：

| 加入物(μl)              | 1    | 2  | 3    | 4  | 5  | 6  |
|----------------------|------|----|------|----|----|----|
| 丙酮酸标准(60μg/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(μg/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(60μg/ml,匀浆液配制) | 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(μg/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            |          |     |     |
| PA Assay Buffer | 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       | —   | —   |
| 匀浆液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            |          |     |     |
| PA Assay Buffer | 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 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ )。

### 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 $A_{\text{标准}}$ 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( $\mu\text{g/ml}$ )

$N$ =稀释倍数

$m$ =样品的质量(g)

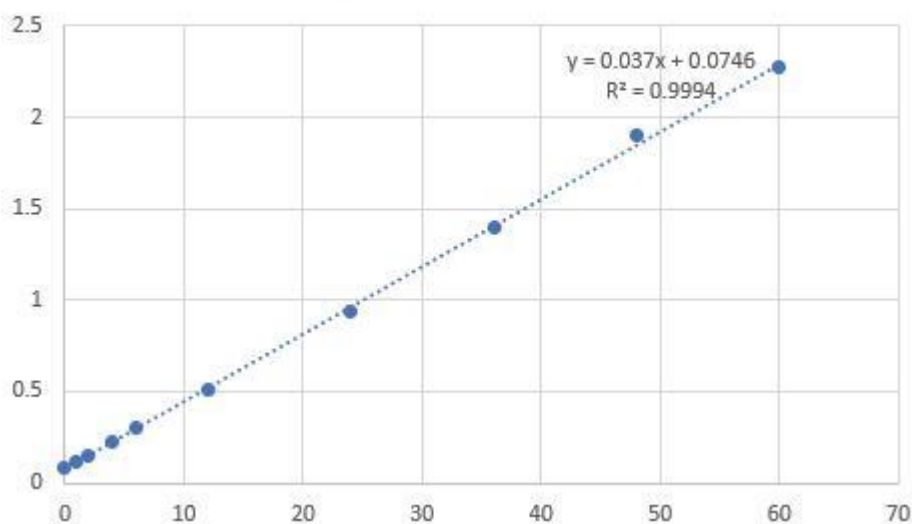
### 注意事项

- 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 PA Assay Buffer(1×)。
- 2、配制的丙酮酸标准( $60\mu\text{g/m}$ )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 $\mu\text{g/ml}$ 。
- 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。
- 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。

**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1~60μg/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、60μg/ml时的吸光度，作出标准曲线如下：

丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)



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 1μg/ml 以下，标准品浓度在 60μg/ml 以上，标准曲线会有偏差。