

版本：精简版

修改日期：2023.12.28

丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯胂微板法)

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胂比色法。

Leagene 丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯胂微板法)检测原理是在酸性条件下,丙酮酸与二硝基苯胂反应,生成丙酮酸-二硝基苯胂复合物,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	TC0750	Storage
		100T	
试剂(A): 丙酮酸标准(6mg/ml)		1ml	4°C 避光
试剂(B): 组织匀浆液(3×)		100ml	RT 避光
试剂(C): 苯胂显色液		3ml	4°C 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°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，取上清液离心，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，取上清液离心，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检测，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，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°C 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 $3\sim 9\mu\text{g/ml}$ 。
- 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。