

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K130-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(480-520 nm)

Elabscience®丙酮酸比色法测试盒

Pyruvic Acid Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

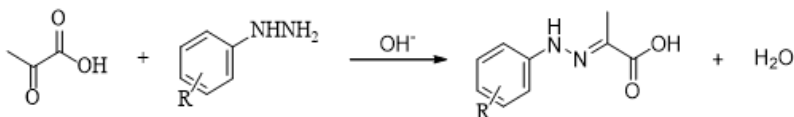
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织中的丙酮酸含量。

检测原理

丙酮酸与显色剂反应，反应产物在碱性溶液中呈红棕色，颜色的深浅与丙酮酸含量成正比，通过比色可以计算出丙酮酸的含量。



本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	澄清剂 (Clarificant)	0.6 mL×1 支	1.2 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	碱试剂 (Alkali Reagent)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	2 μmol/mL 丙酮酸钠 标准品 (2 μmol/mL Sodium Pyruvate Standard)	1.6 mL×1 支	1.6 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(480-520 nm, 最佳检测波长 505 nm)

试剂：双蒸水、生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS(0.01 M, pH 7.4)

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/mL}$)	0	0.1	0.2	0.6	0.8	1.2	1.6	2.0
2 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品(μL)	0	5	10	30	40	60	80	100
双蒸水(μL)	100	95	90	70	60	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：可直接测定。

组织样本：取 0.020-1.0 g 新鲜组织块，按照重量 (g)：体积 (mL) =1:9 的比例加入生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS(0.01 M, pH 7.4)，进行匀浆，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.003-2.0 μmol/mL，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%小鼠肝脏组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	10%大鼠肾脏组织	不稀释
小鼠血浆	不稀释	10%大鼠心组织	不稀释

注：稀释液为 PBS(0.01 M, pH 7.4)或生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

血清血浆样本

- ① 标准孔：取 15 μL 不同浓度的标准品加入到酶标板孔中；
测定孔：取 15 μL 待测样本加入到酶标板孔中；
- ② 向①步骤中标准孔、测定孔加入 50 μL 试剂二。
- ③ 酶标仪振板 10 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。
- ④ 向③步骤中标准孔、测定孔加入 150 μL 试剂三。
- ⑤ 酶标仪振板 10 s, 室温静置 5 min, 酶标仪 505 nm 测 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	15	--
待测样本(μL)	--	15
试剂二(μL)	50	50
酶标仪振板 10 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min		
试剂三(μL)	150	150
酶标仪振板 10 s, 室温静置 5 min, 酶标仪 505 nm 测 OD 值。		

组织样本

- ① 标准孔：取 15 μL 不同浓度的标准品加入到酶标板孔中；
测定孔：取 15 μL 待测样本加入到酶标板孔中；
- ② 向①步骤中标准孔、测定孔依次加入 10 μL 试剂一，50 μL 试剂二。
- ③ 酶标仪振板 10 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。
- ④ 向③步骤中标准孔、测定孔加入 150 μL 试剂三。
- ⑤ 酶标仪振板 10 s，室温静置 5 min，酶标仪 505 nm 测 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	15	--
待测样本(μL)	--	15
试剂一(μL)	10	10
试剂二(μL)	50	50
酶标仪振板 10 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min		
试剂三(μL)	150	150
酶标仪振板 10 s，室温静置 5 min，酶标仪 505 nm 测 OD 值。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)等液体样本中丙酮酸计算:

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量} &= (\Delta A_{505} - b) \div a \times f \\ (\mu\text{mol/mL}) & \end{aligned}$$

组织中丙酮酸计算:

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量} &= (\Delta A_{505} - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}} \\ (\mu\text{mol/mgprot}) & \end{aligned}$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 吸光度对应的浓度

a: 标曲斜率

b: 标曲截距

ΔA_{505} : 测定孔 OD 值-空白 OD 值, 空白 OD 值为标准品浓度为 0 时的 OD 值

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度(mg/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

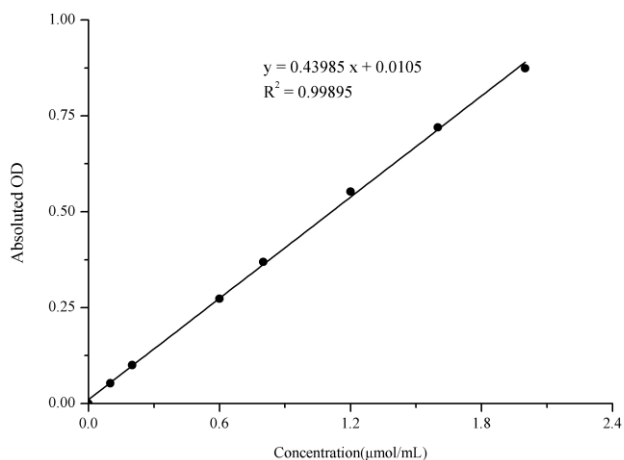
检测范围	0.003-2.0 $\mu\text{mol/mL}$	平均批间差	3.6 %
灵敏度	0.003 $\mu\text{mol/mL}$	平均批内差	2.3 %
平均回收率	95 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准品浓度测定数据:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0.0	0.1	0.2	0.6	0.8	1.2	1.6	2.0
OD 值	0.047	0.105	0.145	0.326	0.419	0.601	0.768	0.896
	0.049	0.097	0.152	0.317	0.415	0.600	0.769	0.949
平均 OD 值	0.048	0.101	0.148	0.321	0.417	0.601	0.768	0.922
绝对 OD 值	0.000	0.053	0.100	0.273	0.369	0.553	0.720	0.874

② 制标准曲线, 如下图所示:



附录2 实例分析

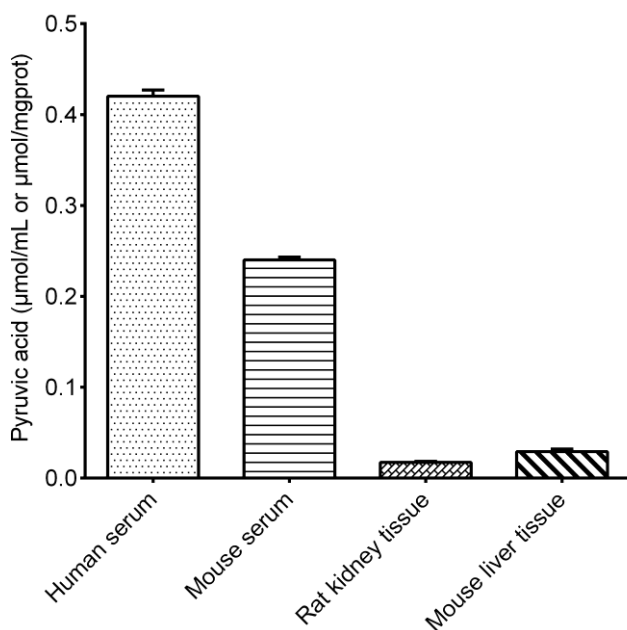
例如检测人血清(数据仅供参考):

取15 μL 人血清样本, 按照说明书操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 0.4983x + 0.0123$, 测定孔平均OD值为0.269, 空白孔平均OD值为0.047, 计算结果为:

$$\text{丙酮酸含量} = (0.269 - 0.047 - 0.0123) \div 0.4983 = 0.42 \mu\text{mol/mL} \\ (\mu\text{mol/mL})$$

按照说明书操作, 测定人血清(加样量15 μL)、小鼠血清(加样量15 μL)、10%大鼠肾脏组织(10%组织的蛋白含量10.36 mgprot/mL, 加样量15 μL)和10%小鼠肝脏组织(10%组织的蛋白含量12.72 mgprot/mL, 加样量15 μL)中含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(3):489–505. IF:4.418
6. Ren F, Xu X, Xu J B, et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. *Life sciences*, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688

