

(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-F058

产品规格：48T(32 samples)96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®丙酮酸荧光法测试盒

Pyruvate Fluorometric 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)、尿液、动物组织和细胞样本中的丙酮酸的含量。

检测原理

丙酮酸(Pyruvate)原为焦性葡萄糖酸，是生物体内的一种重要成分，主要参与糖、脂肪等的代谢，也是碳水化合物代谢的中间产物之一。本试剂盒的检测原理为丙酮酸在酶试剂的作用下发生一系列反应，最终生成的物质可与显色剂发生显色反应，通过测定激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 的荧光值大小来计算样本中丙酮酸的含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	14 mL×1 瓶	28 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	辅酶 I (Coenzyme I)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	粉剂×3 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	辅酶 II (Coenzyme II)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶溶液 (Enzyme Solution)	0.9 mL×1 支	1.8 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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：荧光酶标仪(激发波长：535 nm，发射波长 587 nm)，恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃，试剂五置于冰盒上待用。

② 试剂二工作液的配制：

用2 mL的试剂一溶解试剂二，混匀至完全溶解，未使用完的试剂二工作液可分装-20℃避光保存1个月。

③ 试剂三工作液的配制：

用2 mL的试剂一溶解试剂三，未使用完的试剂三工作液可分装-20℃避光保存7天。

④ 试剂四工作液的配制：

用0.2 mL的试剂一溶解试剂四，未使用完的试剂四工作液可分装-20℃避光保存1个月。

⑤ 酶工作液的配制：

将试剂五：试剂一按体积比=1：3混匀，放置冰盒上待用，按需配制，现配现用。

⑥ 反应工作液的配制：

试剂二工作液：试剂三工作液：酶工作液按体积比=1：1：3混匀，放置冰盒上待用，按需配制，现配现用。

⑦ 显色工作液的配制：

试剂四工作液：试剂六：试剂一按体积比=3：1：95混匀，按需配制，现配现用。

⑧ 100 μmol/L标准品溶液的配制：

将试剂七与双蒸水=1:9体积比进行稀释，未使用完的标准品溶液-20℃可避光保存1个月。

⑨ 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($\mu\text{mol/L}$)	0	20	30	40	50	60	70	100
100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液(μL)	0	40	60	80	100	120	140	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	100	80	60	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)、尿液样本: 取样本置于10 KD超滤管, 12000 \times g离心10 min, 取超滤后的滤液待测, 当天检测有效。

组织样本: 按照组织样本质量(g): 生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)= 1: 9 匀浆, 12000 \times g离心10 min, 取离心后的上清置于10 KD超滤管, 12000 \times g离心10 min, 取超滤后的滤液待测, 当天检测有效。

细胞样本: 按照约 1×10^6 个细胞: 生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)= 1:0.2 比例匀浆, 12000 \times g离心10 min, 匀浆离心后的上清置于10 KD超滤管, 12000 \times g离心10 min, 取超滤后的滤液待测, 当天检测有效。

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: 1.00-100.00 $\mu\text{mol/L}$, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
豚鼠血清	不稀释	人血清	不稀释
兔血清	1-2	大鼠血清	1-2
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
1×10^6 个 293T 细胞	不稀释	1×10^6 个 HeLa 细胞	不稀释
1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释

注: 样本稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔:取 20 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。
测定孔:取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔中加入 100 μL 反应工作液。
- ③ 向步骤②中各孔中加入 100 μL 显色工作液。
- ④ 振板 3 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 荧光酶标仪设置激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm, 测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
反应工作液(μL)	100	100
显色工作液(μL)	100	100
振板 3 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 荧光酶标仪设置激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm, 测定各孔荧光值。		

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

血清(浆)、尿液样本中丙酮酸含量计算公式:

$$\begin{array}{l} \text{丙酮酸} \\ (\mu\text{mol/L}) \end{array} = (\Delta F - b) \div a \times f$$

组织样本中丙酮酸含量计算公式:

$$\begin{array}{l} \text{丙酮酸} \\ (\mu\text{mol/kg wet weight}) \end{array} = (\Delta F - b) \div a \div \frac{m}{v} \times f$$

细胞样本中丙酮酸含量计算公式:

$$\begin{array}{l} \text{丙酮酸} \\ (\mu\text{mol}/10^9) \end{array} = (\Delta F - b) \div a \div \frac{n}{v} \times f$$

注解:

y: 标准孔荧光值-空白孔荧光值(标准品浓度为 0 时荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本测定孔荧光值-空白孔荧光值

n: 细胞样本数量, 10^6

m: 匀浆样本质量, g

v: 匀浆液体积, mL

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

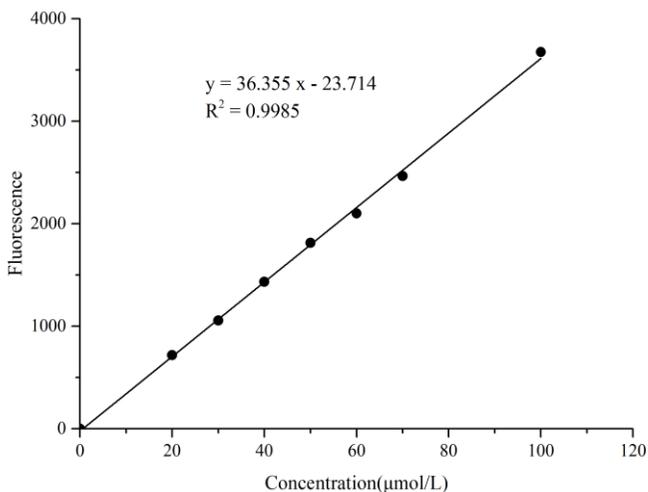
检测范围	1.00-100 $\mu\text{mol/L}$	批间差	2.0-4.0%
灵敏度	1.00 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.0-2.0%
加标回收率	98-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	20	30	40	50	60	70	100
荧光值	482	1208	1546	1913	2316	2570	2961	4162
	502	1212	1551	1938	2295	2613	2955	4171
平均荧光值	492	1210	1548	1926	2306	2592	2958	4166
绝对荧光值	0	718	1056	1434	1814	2100	2466	3674

② 绘制标曲(如下图)：



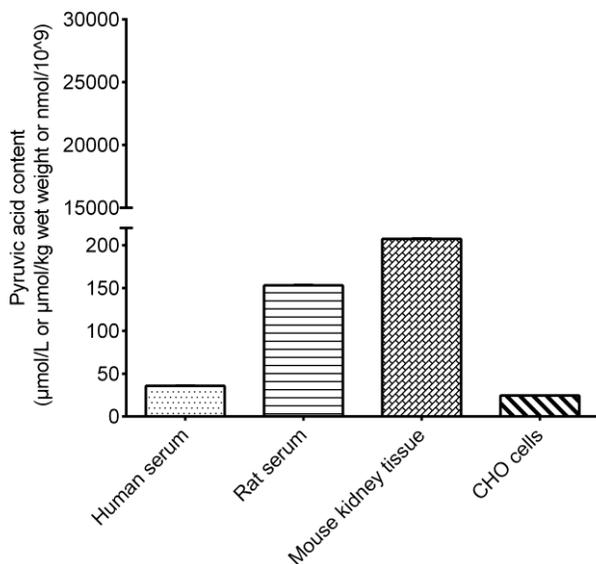
附录2 实例分析

例如检测小鼠肾组织(数据仅供参考):

取10%的小鼠肾组织样本匀浆20 μL 超滤液, 按操作表操作, 结果如下:
标准曲线: $y = 36.355x - 23.714$, 测定孔荧光值 $F_{\text{测}}$ 为1278, 空白孔荧光值 $F_{\text{空}}$ 为462, $\Delta F = 1278 - 462 = 816$, 计算结果为:

$$\text{丙酮酸} = (816 + 23.714) \div 36.355 \div (0.1 \div 0.9) = 207.88 \mu\text{mol/kg wet weight} (\mu\text{mol/kg wet weight})$$

按说明书操作, 测定人血清(加样量20 μL)、大鼠血清(加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(加样量20 μL)、 1×10^6 个CHO细胞(加样量20 μL)的丙酮酸含量(如下图所示):



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。

