

丙酮酸 (pyruvic acid PA) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0870F 分光法 48 样)

一、产品简介:

丙酮酸在各种生化途径中起着重要作用,可在糖异生过程中转化为碳水化合物,或通过乙酰 CoA 转化为脂肪酸。

丙酮酸可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙,在碱性溶液中显棕红色;通过在 520nm 读取吸光值即可得出丙酮酸含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	标准品母液为 20μmol/mL

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、丙酮酸 (PA) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,转移至新 EP 管中,置于冰上孵育 10min 后,12000rpm,4℃离心 10min,取上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量 (g):提取液体积(mL)为 5~10:1 的比例进行提取

- ② 称取水分充足样本约 0.5g,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,转移至新 EP 管中,由于样本水分较多,可定容为 1.5mL 即 V2,再把样本置于冰上孵育 10min 后,12000rpm,4℃离心 10min,取上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量 (g):提取液体积(mL)为 5~10:1 的比例进行提取

- ③ 细菌/培养细胞:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎 (冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次),转移至新 EP 管中,置于冰上孵育 10min 后,12000rpm,4℃离心 10min,取上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量 (10⁴):提取液 (mL) 为 500~1000:1 的比例进行提取。

- ④ 液体样品:取液体约 0.5mL 即 V3,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,转移至新 EP 管中,置于冰上孵育 10min 后,12000rpm,4℃离心 10min,取上清液待测。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 520nm,蒸馏水调零。
- ② 标准品母液为 20μmol/mL,临用前用提取液稀释 40 倍 (如 10μL 标准品+390μL 提取液):即为 0.5 μmol/mL,待用。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	70		
标准品		70	

提取液			70
试剂一	140	140	140
混匀，37℃孵育 10min			
试剂二	700	700	700
混匀，室温（25℃）5min 后立即于 520nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以于样本制备时增加样本质量 W（不可改变加样表中样本量 V1），则改变后的 W 需代入计算公式重新计算。

五、计算公式：

1、按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times Mr \div (W \times V_1 \div V) \\ = 44.03 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W$$

2、按照水分充足样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_2 \times Mr \div W \\ = 66.05 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \\ \times Mr \div (500 \times V_1 \div V) = 0.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

4、按照液体体积计算

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/mL}) = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (V_3 + V) \div V_3 \times Mr \\ = 132.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

C 标准---0.5 $\mu\text{mol/mL}$;

V1---反应中样品体积，0.07mL;

V3---液体样本取样体积，0.5mL;

W---样品质量，g;

V---加入提取液体积，1mL;

V2---液体充分样本定容体积，1.5mL;

Mr---丙酮酸分子量，88.06;

500---细菌或细胞总数，500 万。