

丙酮酸 (pyruvic acid PA) 含量测定试剂盒说明书

微板法 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C保存	标准品母液为 20 μ mol/mL

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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°C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°C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°C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 (10^4):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°C离心 10min,取上清液待测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 520nm。
- ② 标准品母液为 20 μ mol/mL,临用前用提取液稀释 40 倍 (如 10 μ L 标准品+390 μ L 提取液):即为 0.5 μ mol/mL,待用。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	20		
标准品		20	
提取液			20

试剂一	40	40	40
混匀, 37℃ 孵育 10min			
试剂二	200	200	200
混匀, 室温 (25℃) 5min 后立即于 520nm 读取各管吸光值 A。			

【注】若△A 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

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{Mr} \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \\ &= 44.03 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \end{aligned}$$

2、按照水充分样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= \text{C 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{V2} \times \text{Mr} \div \text{W} \\ &= 66.05 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \end{aligned}$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \\ &\quad \times \text{Mr} \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) = 0.09 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/mL}) &= \text{C 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times (\text{V3} + \text{V}) \div \text{V3} \times \text{Mr} \\ &= 132.09 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \end{aligned}$$

C 标准---0.5μmol/mL;

V1---反应中样品体积, 0.02mL;

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。