

# 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℃保存 |                  |
| 试剂一  | 液体 4mL×1 瓶   | 4℃保存 |                  |
| 试剂二  | 液体 20mL×1 瓶  | 4℃保存 |                  |
| 标准品  | 液体 1mL×1 支   | 4℃保存 | 标准品母液为 20μmol/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℃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（10<sup>4</sup>）：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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm。

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 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 标准管（仅做一次） | 空白管（仅做一次） |
|----------|-----|-----------|-----------|
| 样本       | 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。