

土壤丙酮酸（S-PA）含量测定试剂盒说明书

(货号: G0357F 分光法 24 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。乳酸脱氢酶 (LDH) 可使丙酮酸转化为乳酸,同时使 NADH 氧化, WST 显色剂可与 NADH 反应,生成 Formazan, 该物质在 450nm 处有最大吸收波长,通过检测该物质生成量的多少可计算丙酮酸含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂分装后 -20℃保存,禁止反复冻融,一周内用完。
试剂三	粉体 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解,可-20℃分装冻存,禁止反复冻融。
试剂四	液体 mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、水浴锅/金属浴、蒸馏水。

四、土壤丙酮酸 (S-PA) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

称取约 0.1g 风干土,加入 1mL 蒸馏水,室温超声 30min, 12000rpm, 室温离心 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 0.05~0.1: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 450nm,蒸馏水调零。
- ② 试剂解冻至室温 (25℃),或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二可按照 600:30 比例配成混合液 (一枪加 630μL 该混合液) (该混合液用多少配多少,现配现用)。
- ④ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

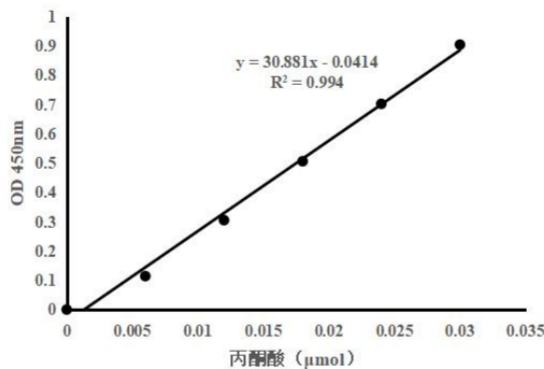
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管
上清液	60	60	
蒸馏水		60	60
试剂一	600	600	600
试剂二	30		30
试剂三	30		30
试剂四	30	30	30
混匀 (轻轻晃动几下), 37℃下孵育 30min 后于 450nm 下读取吸光值, (若吸光度继续下降,直到吸光值保持 2min 内稳定不变为止。)			

$$\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$$

- 【注】1. 若 ΔA 小于 0.01，可以增加样本量 V_1 （如由 60 μ L 增至 100 μ L，则试剂一相应减少，保持总体积不变），或增加样本取样质量 W ，则改变后的 V_1 或 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若 $A_{\text{测定}}$ 小于 0.2，则需要对样本上清进行稀释，并将稀释倍数 D 带入公式计算。

五、计算公式：

- 1、标准曲线： $y = 30.881x - 0.0414$ ， x 为丙酮酸(μ mol)， y 为 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{土壤丙酮酸(S-PA)含量}(\mu\text{mol/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0414) \div 30.881] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.54 \times (\Delta A + 0.0414) \div W \times D \end{aligned}$$

V ---提取液体积，1mL；

V_1 ---反应中样品体积，60 μ L=0.06ml；

W ---样品质量，g；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品浓度：临用前加甩几下使粉体落入底部，再加入 0.5mL 蒸馏水溶解即得标准品浓度为 100 μ mol/mL。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作，把样本上清液换成各个浓度的标准品，以 $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 测定做为纵坐标，依据结果即可制作标准曲线。