

土壤丙酮酸（S-PA）含量测定试剂盒说明书

(货号: G0357W 微板法 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。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 25mL×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×1 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:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、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:

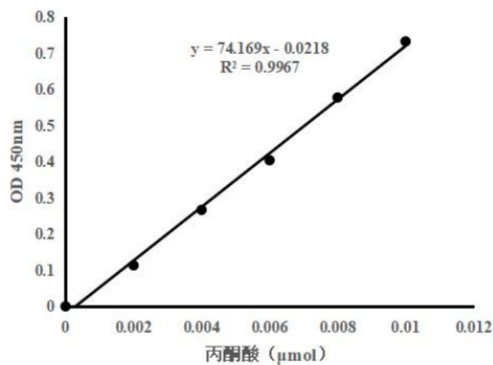
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25℃), 或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二可按照 150:10 比例配成混合液 (一枪加 160μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管
样本	20	20	
蒸馏水		20	20
试剂一	150	150	150
试剂二	10		10
试剂三	10		10
试剂四	10	10	10
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 20 μ L 增至 50 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 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: $y = 74.169x - 0.0218$, x 为丙酮酸(μ mol), y 为 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算:

$$\text{土壤丙酮酸(S-PA)含量}(\mu\text{mol/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0218) \div 74.169] \div (V_1 \div V \times W) \times D$$

$$= 0.674 \times (\Delta A + 0.0218) \div W \times D$$

V ---提取液体积, 1mL;

V_1 ---反应中样品体积, 20 μ L=0.02ml;

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 $\Delta A = A$ 空白- A 测定做为纵坐标, 依据结果即可制作标准曲线。