

丙酮酸 (pyruvic acid PA) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0807W 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。乳酸脱氢酶 (LDH) 可使丙酮酸转化为乳酸,同时使 NADH 氧化,利用 NADH 在 340nm 的下降量来计算丙酮酸含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	4°C 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°C 保存,禁止反复冻融,一周内用完。
试剂三	粉体 mg×2 支	-20°C 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°C 分装冻存,禁止反复冻融。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C 保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。 使用方法:用前标准管 (PA) 甩几下使粉剂落入底部,再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 100 μ mol/mL,再稀释 50 倍成 2 μ mol/mL 的 PA 后备用;按照加样表中测定管操作(样本更换成备用浓度标准品)。

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、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 组织样本:称取约 0.1g 组织,水分充足的样本可取约 0.5g,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,12000rpm,室温离心 10min,取上清液待测。(若组织样本蛋白含量很高,可进行脱蛋白处理)

【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 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),12000rpm,室温离心 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。

- ③ 液体样品:近似中性的澄清液体样本可直接检测;若为酸性样本则需先用 NaOH(2M)调 PH 值约 7.4,然后室温静置 30min,取澄清液体直接检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25°C),或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二可按照 160:10 比例配成混合液(一枪加 170 μ L 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
样本	20
试剂一	160
试剂二	10
混匀，25°C下孵育 2min 后于 340nm 下读取 A1	
试剂三	10
混匀（轻轻拍打板子几下），25°C下孵育 5min 后于 340nm 下读取 A2，（若吸光度继续下降，直到吸光值保持 2min 内稳定不变为止。） $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】若 ΔA 小于 0.01，可以增加样本量 $V1$ （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 和细胞数量，则改变后的 $V1$ 或 W 或细胞数量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：

$$\text{丙酮酸 (PA) 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 279.6 \times \Delta A \div W$$

2、按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{丙酮酸 (PA) 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) = 279.6 \times \Delta A \div 500$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{丙酮酸 (PA) 含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 = 279.6 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

$V1$ ---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

$V2$ ---反应总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr ---丙酮酸分子量，88.06；

W ---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万。