

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：

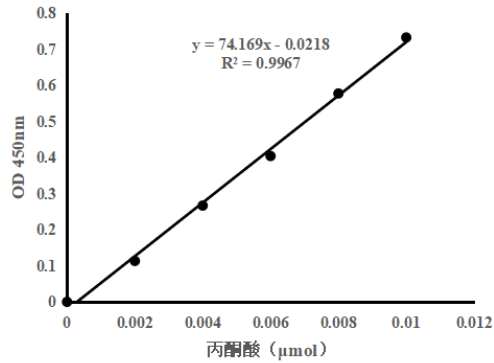
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
- ② 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二可按照 150:10 比例配成混合液（一枪加 160μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

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

五、计算公式：

1、标准曲线： $y = 74.169x - 0.0218$ ，x 为丙酮酸(μmol)，y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{土壤丙酮酸(S-PA)含量}(\mu\text{mol/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0218) \div 74.169] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.674 \times (\Delta A + 0.0218) \div W \times D \end{aligned}$$

V---提取液体积，1mL；

V1---反应中样品体积， $20\mu\text{L}=0.02\text{ml}$ ；

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 $100\mu\text{mol/mL}$ 。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, $0.5\mu\text{mol/mL}$ 。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。