Pyruvic Acid Content Assay Kit

丙酮酸（PA）含量测定试剂盒说明书

货号：G0807F | 方法：紫外分光法 | 规格：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，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 60mL×1 瓶	4℃保存	
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。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃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 100μmol/mL，再稀释 100 倍成 1μmol/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：

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、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 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。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，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 650:20 比例配成混合液（一枪加 670μL 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
样本	60
试剂一	650
试剂二	20
混匀，25℃下孵育 2min 后于 340nm 下读取 A1	
试剂三	20
混匀（轻轻晃动几下），25℃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。）△A=A1-A2。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、计算公式：

1、按照样品质量计算：

丙酮酸（PA）含量(μg/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×10^6]÷(W×V1÷V)=174.7×ΔA ÷W

2、按照细菌或细胞密度计算：

丙酮酸（PA）含量(μg/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×10^6]÷(500×V1÷V)= 174.7×ΔA÷500

3、按照液体体积计算：

丙酮酸（PA）含量(μg/mL)=[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×10^6]÷V1=174.7×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.3×10^3 L/mol/cm；　d---96 孔板光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；　V1---加入反应体系中样本体积，0.06mL；

V2---反应总体积，7.5×10^{-4} 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。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。