

丙酮酸(PA)含量检测试剂盒说明书

Pyruvate Assay Kit

分光光度法

货号: AK056

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES06	50ml×1	4℃保存
AK056-A	8ml×1	4℃避光保存
AK056-B	35ml×1	4℃保存
AK056-标准品	1ml×1(1mg/ml)	4℃保存

简介:

意义: 丙酮酸通过乙酰 CoA 连接葡萄糖、脂肪酸和氨基酸三大代谢, 起着重要的枢纽作用。

原理: 丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用, 生成丙酮酸-2,4-二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈樱红色。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理 (丙酮酸提取):

1. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES06 体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES06), 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 静置 30min, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清待测。
2. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES06 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES06), 进行冰浴匀浆, 静置 30min, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清待测。
3. 血清 (浆) 样品: 按照血清 (浆) 体积 (mL): 提取液 ES06 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.1mL 血清 (浆) 加入 1mL 提取液 ES06), 进行冰浴匀浆, 静置 30min, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 520nm, 蒸馏水调零。
2. 标准品的准备: 将标准品用蒸馏水稀释至 25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125、0μg/mL。
3. 按照下表进行如下操作:

加样名称	测定管(ul)	标准管(ul)
待测样品	300	
标准液		300
AK056-A	100	100
混匀, 静置 2min		
AK056-B	500	500
混匀, 于 520nm 波长处测定各管吸光值 A。		

丙酮酸含量计算:

1. 标准曲线的绘制: 以各标准溶液浓度为 x 轴, 以 A 标准为 y 轴做标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$; 将 A 测定带入方程求 x 丙酮酸钠含量 (μg/mL) 值。

2. 按照血清（浆）体积计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/mL}) = (x \times V1) \div [V1 \div (V2 + V3) \times V3] = 11x$$

3. 按照蛋白浓度计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = (x \times V1) \div (V1 \times Cpr) = x \div Cpr$$

4. 按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/g 鲜重}) = (x \times V1) \div (W \times V1 \div V2) = x \div W$$

5. 按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (x \times V1) \div (500 \times V1 \div V2) = x \div 500$$

注： V1：加入反应体系中样本体积，0.3mL； V2：加入提取液体积，1 mL； V3：加入血清（浆）体积，0.1 mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g； 500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项：

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
2. 提取液中含有蛋白变性成分，若使用蛋白浓度计算需要另取组样本提取测定。