

丙酮酸(PA)含量检测试剂盒说明书

Pyruvate Assay Kit

微量法

货号: AK057

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES06	100ml×1	4℃保存
AK057-A	3ml×1	4℃避光保存
AK057-B	15ml×1	4℃保存
AK057-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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、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. 分光光度计或酶标仪预热 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	75	
标准液		75
AK057-A	25	25
混匀, 静置 2min		
AK057-B	125	125
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 ($\mu\text{g/mL}$) 值。
2. 按照血清（浆）体积计算
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
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
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
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，0.075mL；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。