



## 丙酮酸(PA)含量检测试剂盒(微量法)

中文名称：**丙酮酸(PA)含量检测试剂盒**

英文名称：Pyruvate(PA) Content Assay Kit

别名：丙酮酸试剂盒 PA Kit 丙酮酸(PA)试剂盒 丙酮酸(PA)测试盒

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

储存条件：2-8°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 3 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 15mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

1、标准品：20 $\mu$ mol/mL 丙酮酸钠标准溶液。

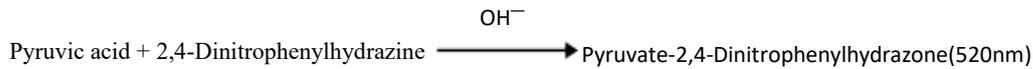
2、0.125 $\mu$ mol/mL 标准溶液的配制：取 50 $\mu$ L 20 $\mu$ mol/mL 标准液和 450 $\mu$ L 蒸馏水混匀，即 2 $\mu$ mol/mL 标准液；再取 50 $\mu$ L 2 $\mu$ mol/mL 标准液和 750 $\mu$ L 蒸馏水混匀即配成 0.125 $\mu$ mol/mL 标准溶液。

产品说明：

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。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。



### 技术指标:

最低检出限: 0.001 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围: 0.0015-0.25 $\mu\text{mol/mL}$

**注意:** 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎 仪、冰和蒸馏水。

### 操作步骤:

#### 一、样本处理(可适当调整待测样本量)

**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<sup>4</sup> 个): 提取液体积 (mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎(冰浴, 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 静置 30min , 8000g, 常温离心 10min, 取上清待测。

**2、组织:** 按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 静置 30min , 8000g, 常温离心 10min, 取上清待测。

**3、血清(浆) 样本等液体:** 按照血清(浆)体积(mL): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议取 0.1mL 液体样本加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 静置 30min , 8000g, 常温离心



10min, 取上清待测。

## 二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 520nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2、操作表: (在 1.5mL EP 管或者 96 孔板中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	75	-	-
标准溶液	-	75	-
蒸馏水	-	-	75
试剂一	25	25	25
充分混匀后常温静置 2min			
试剂二	125	125	125
充分混匀后于 520nm 波长处测定吸光值, 记为 A 测定管、A 标准管、A 空白管, 计算 $\Delta A$ 测定=A 测定管-A 空白管, $\Delta A$ 标准=A 标准管-A 空白管。空白管和标准管只需做 1-2 次。			

## 三、丙酮酸含量计算

### 1、按照血清(浆)体积计算

丙酮酸含量( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )=  $\Delta A$  测定 $\div$  $\Delta A$  标准 $\times C$  标准 $\times (V$  提取 $+V$  液体) $\div V$  液体= 0.1375 $\times$

$\Delta A$  测定 $\div \Delta A$  标准

### 2、按照样本蛋白浓度计算

丙酮酸含量( $\mu\text{mol}/\text{mg prot}$ )=  $\Delta A$  测定 $\div \Delta A$  标准 $\times C$  标准 $\times V$  样本 $\div (V$  样本 $\times C_{pr}) = 0.125$

$\times \Delta A$  测定 $\div \Delta A$  标准 $\div C_{pr}$

### 3、按照样本质量计算

丙酮酸含量( $\mu\text{mol}/\text{mg prot}$ )=  $\Delta A$  测定 $\div \Delta A$  标准 $\times C$  标准 $\times V$  提取 $\div (V$  提取 $\times C_{pr}) = 0.125$

$\times \Delta A$  测定 $\div \Delta A$  标准 $\div C_{pr}$

### 4、按照细菌或细胞数量计算



丙酮酸含量( $\mu\text{mol} / 10^4 \text{ cell}$ ) =  $\Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 提取} \div N = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N$

C 标准:  $0.125 \mu\text{mol}/\text{mL}$  标准溶液; V 提取: 加入提取液体积,  $1 \text{ mL}$ ; V 液体: 加入血清(浆)等液体体积,  $0.1 \text{ mL}$ ; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ; W: 样本质量,  $\text{g}$ ; N: 细菌或细胞总数, 以万计。

#### 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。

#### 实验实例:

1. 称取约  $0.1171 \text{ g}$  兔肝, 加入  $1 \text{ mL}$  提取液, 进行冰浴匀浆, 静置  $30 \text{ min}$ ,  $8000 \text{ g}$ , 常温离心  $10 \text{ min}$ , 取上清待测。之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管} = 0.544 - 0.085 = 0.459$ ,  $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.436 - 0.085 = 0.351$ , 计算丙酮酸含量得:

$$PA(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 1.396 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$$

2. 称取约  $0.1094 \text{ g}$  合欢, 加入  $1 \text{ mL}$  提取液, 进行冰浴匀浆, 静置  $30 \text{ min}$ ,  $8000 \text{ g}$ , 常温离心  $10 \text{ min}$ , 取上清用蒸馏水稀释 2 倍后待测。之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管} = 0.552 - 0.085 = 0.467$ ,  $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.436 - 0.085 = 0.351$ , 计算丙酮酸含量得:

$$PA(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times \text{稀释倍数} = 3.040 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$$

3. 取  $50 \mu\text{L}$  兔血清之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管} = 0.125 - 0.085 = 0.040$ ,  $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.436 - 0.085 = 0.351$ , 计算丙酮酸含量得:



$$PA(\mu\text{mol/mL})=0.1375 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.016 \mu\text{mol/mL}$$