



丙酮酸(PA)含量检测试剂盒

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

产品储存：2-8°C

有效期：6个月

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

检测方法：微量法

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

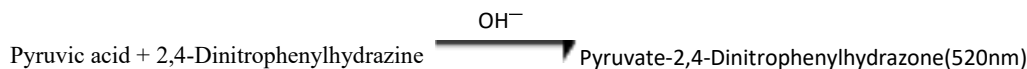
溶液的配制：

- 1、标准品：20 μ mol/mL 丙酮酸钠标准溶液。
- 2、0.125 μ mol/mL 标准溶液的配制：取 50 μ L 20 μ mol/mL 标准液和 450 μ L 蒸馏水混匀，即 2 μ mol/mL 标准液；再取 50 μ L 2 μ mol/mL 标准液和 750 μ L 蒸馏水混匀即配成 0.125 μ 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:

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(10⁴ 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($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准} \times V_{提取} \div (V_{提取} \times C_{pr}) = 0.125$



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

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, 1mL ; V 液体: 加入血清(浆)等液体体积, 0.1mL ; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL ; W: 样本质量, 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 0.1171g 兔肝, 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。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 0.1094g 合欢, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 静置 30min , 8000g , 常温离心 10min , 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 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}$



$=0.125-0.085=0.040$, ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管 $=0.436-0.085 = 0.351$, 计算丙酮酸

含量得:

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