

丙酮酸（pyruvic acid PA）含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意： 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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，在碱性溶液中呈显色。

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、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 12.5mL×1 瓶，4℃ 保存。

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（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，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，25℃离心 10min，取上清待测。
- 3、血清（浆）样品：按照血清（浆）体积（mL）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议取 0.1mL 血清（浆）加入 1mL 提取液），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、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 75 μL 样本和 25 μL 试剂一，混匀，静置 2min，加入 125 μL 试剂二，混匀，于 520nm 波长处测定管吸光值 A。

丙酮酸含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0466x + 0.0675$ ；x 为丙酮酸含量（μg/mL），y 为吸光值。
- 2、按照血清（浆）体积计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $[(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 214.6 \times (A-0.0675)$

3、按照蛋白浓度计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g/mg prot}$) = $[(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 21.46 \times (A-0.0675) \div Cpr$

4、按照样品质量计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g/g}$ 鲜重) = $[(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 21.46 \times (A-0.0675) \div W$

3、按照细菌或细胞密度计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g}/10^4$ cell) = $[(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.043 \times (A-0.0675)$

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。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0233x + 0.0675$; x 为丙酮酸含量 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值。

2、按照血清(浆)体积计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $[(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 429.2 \times (A-0.0675)$

3、按照蛋白浓度计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g/mg prot}$) = $[(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 42.92 \times (A-0.0675) \div Cpr$

4、按照样品质量计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g/g}$ 鲜重) = $[(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 42.92 \times (A-0.0675) \div W$

3、按照细菌或细胞密度计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{g}/10^4$ cell) = $[(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.086 \times (A-0.0675)$

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:

最低检测限为 $1 \mu\text{g/mL}$ 或 $1 \mu\text{g/g}$ 鲜重或 10ng/mg prot