

## 丙酮酸 (pyruvic acid PA) 含量测定试剂盒说明书

## 分光光度法 50 管/48 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，在碱性溶液中呈色。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

**试剂的组成和配制：**

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 25mL×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（ $10^4$  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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。
- 2、取 300 $\mu$ L 样本+100 $\mu$ L 试剂一于 1.5mL EP 管中，混匀，静置 2min，加入 500 $\mu$ L 试剂二，混匀，于 520nm 波长处测定管吸光值 A。

**丙酮酸含量计算：**

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（ $\mu$ g/mL），y 为吸光值。

2、按照血清（浆）体积计算

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

3、按照蛋白浓度计算

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

4、按照样品质量计算

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

3、按照细菌或细胞密度计算

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

V1：加入反应体系中样本体积，0.3mL；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。



Lifemall.asia

To be with you