

## 丙酮酸(pyruvic acid PA)含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-T026 微板法 96 样)

有效期: 3 个月

### 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, 在碱性溶液中呈樱红色。

### 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 (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, 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 75μL 上清液和 25μL 试剂一, 混匀, 静置 2min, 加入 125μL 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

标准条件下测定回归方程为  $y = 0.0466x + 0.0675$ ; x 为丙酮酸钠含量 (μg/mL), y 为吸光值。

1、按照血清 (浆) 体积计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/mL}) = (A - 0.0675) \div 0.0466 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 214.6 \times (A - 0.0675)$$

2、按照蛋白浓度计算

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

3、按照样品质量计算

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

4、按照细菌或细胞密度计算

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

V 样: 加入血清 (浆) 体积, 0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, 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**

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

1、按照血清(浆)体积计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/mL}) = (A - 0.0675) \div 0.0233 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 429.2 \times (A - 0.0675)$$

2、按照蛋白浓度计算

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

3、按照样品质量计算

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

4、按照细菌或细胞密度计算

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

$V_{\text{样}}$ : 加入血清(浆)体积, 0.1 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。