

丙酮酸(pyruvic acid PA)含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T026 分光法 48 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、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(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、取 300μL 上清液+100μL 试剂一于 1.5mL EP 管中,混匀,静置 2min。

2、加入 500μL 试剂二,混匀,于 520nm 波长处,用蒸馏水调零,记录测定管吸光值 A。

丙酮酸含量计算:

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

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

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; C_{pr}: 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。