

丙酮酸（pyruvic acid PA）含量-2,4-二硝基苯肼比色法测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-S014-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

丙酮酸在各种生化途径中起着重要作用，可在糖异生过程中转化为碳水化合物，或通过乙酰 CoA 转化为脂肪酸。

丙酮酸可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙，在碱性溶液中显棕红色；通过在 520nm 读取吸光值即可得出丙酮酸含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前加 1ml 提取液即为标准品母液，浓度为 20 μmol/mL； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- ① 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至新 EP 管中，置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 5~10：1 的比例进行提取

- ② 称取水分充足样本约 0.5g，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至新 EP 管中，由于样本水分较多，可定容为 1.5mL 即 V2，再把样本置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 5~10：1 的比例进行提取

- ③ 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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），转移至新 EP 管中，置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ④ 液体样品：取液体约 0.5mL 即 V3，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至新 EP 管中，置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液待测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm。
- ② 标准品母液为 20μmol/mL，临用前用提取液稀释 40 倍（如 10μL 标准品+390μL 提取液）：即为 0.5 μmol/mL，待用。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	标准管（仅做一次）	空白管（仅做一次）
样本	20		

标准品		20	
提取液			20
试剂一	40	40	40
混匀，37℃孵育 10min			
试剂二	200	200	200
混匀，室温（25℃）5min 后立即于 520nm 读取各管吸光值 A。			

【注】若△A 的值在零附近徘徊，可以于样本提取时增加样本质量 W（不可改变加样表中样本量 V1），则改变后的 W 需代入计算公式重新计算。

五、计算公式：

1、按照样品质量计算

$$\begin{aligned}\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/g 鲜重}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times Mr \div (W \times V1 \div V) \\ &= 44.03 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

2、按照水分充足样品质量计算

$$\begin{aligned}\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/g 鲜重}) &= C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V2 \times Mr \div W \\ &= 66.05 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned}\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times Mr \div (500 \times V1 \div V) \\ &= 0.09 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})\end{aligned}$$

4、按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mL}) &= C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times (V3 + V) \div V3 \times Mr \\ &= 132.09 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})\end{aligned}$$

5、按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mg prot}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times Mr \div (Cpr \times V1 \div V) \\ &= 44.03 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr\end{aligned}$$

6、按照水分充足样品蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mg prot}) &= C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V2 \times Mr \div Cpr \\ &= 66.05 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr\end{aligned}$$

C 标准---0.5μmol/mL;

V---加入提取液体积，1mL;

V1---反应中样品体积，0.02mL;

V2---液体充分样本定容体积，1.5mL;

V3---液体样本取样体积，0.5mL;

Mr---丙酮酸分子量，88.06;

W---样品质量，g;

500---细菌或细胞总数，500 万;

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。