

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0399

Size: 100T/96S

丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×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	—
丙酮酸钠标准液	1mg/mL: 液体 1mL×1 瓶	4℃保存	—

操作步骤:

一、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,

常温离心 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，常温离心 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，常温离心 10min，取上清待测。

4、标准品的准备：将标准品用蒸馏水稀释至 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0 ug/mL。

二、测定步骤：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

2、在微量玻璃比色皿或 96 孔板中加入 75ul 标准液或样本和 25ul 试剂一，混匀，静置 2min，加入 125ul 试剂二，混匀，于 520nm 波长处测定吸光值 A。

三、丙酮酸含量计算：

1、根据标准品浓度和测定值建立标准曲线；y 为丙酮酸钠含量（μg/mL），x 为吸光值。

2、按照血清（浆）体积计算

$$\text{丙酮酸含量 (}\mu\text{g/mL)} = (y \times V1) \div (V3 \times V1 \div V2) = y \times 10$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{丙酮酸含量 (}\mu\text{g/mg prot)} = (y \times V1) \div (V1 \times Cpr) = y \div Cpr$$

4、按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量 (}\mu\text{g/g 鲜重)} = (y \times V1) \div (W \times V1 \div V2) = y \div W$$

5、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量 (}\mu\text{g}/10^4 \text{ cell)} = (y \times V1) \div (500 \times V1 \div V2) = y \div 500$$

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。