

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

丙酮酸（PA）检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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	液体1mL×1瓶	4℃保存	1mg/mL

产品说明：

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。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、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵、冰、蒸馏水。

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 g/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 75 μ L 标准液或样本和 25 μ L 试剂一, 混匀, 静置 2min, 加入 125 μ L 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 (μ g/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
 $\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mg prot}) = (y \times V1) \div (V1 \times \text{Cpr}) = y \div \text{Cpr}$

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。