

丙酮酸（pyruvic acid PA）含量测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

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。乳酸脱氢酶（LDH）可使丙酮酸转化为乳酸，同时使 NADH 氧化，利用 NADH 在 340nm 的下降量来计算丙酮酸含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解；溶解后-20℃保存 2 周。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解，溶解后仍-20℃保存。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、丙酮酸（PA）含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：称取约 0.1g 组织，水分充足的样本可取约 0.5g，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，室温离心 10min，取上清液待测。（若组织样本蛋白含量很高，可进行脱蛋白处理）

【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 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），12000rpm，室温离心 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。

- ③ 液体样品：近似中性的澄清液体样本可直接检测；若为酸性样本则需先用 NaOH(2M) 调 PH 值约 7.4，然后室温静置 30min，取澄清液体直接检测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂可提前于 25℃下孵育 10min，在 96 孔板中依次加入：

试剂名称	测定管
样本	10
试剂一	170
试剂二	10
混匀，25℃下孵育 2min 后于 340nm 下读取 A1	
试剂三	10
混匀（轻轻拍打板子几下），25℃下孵育 5min 后于 340nm 下读取 A2，（若吸光度继续下降，直到吸光值保持 2min 内稳定不变为止。） $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】1.试剂一和二可按照加样比例提前混合成混合液（用多少混多少，现配现用）。

2.若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本量 V_1 （相应的试剂一减少）或样本准备制备的时候，增加样本质量 W ，则改变后的 V_1 或 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：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 559.1 \times \Delta A \div W$$

2、按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) = 1.12 \times \Delta A$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div V_1 = 559.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d ---96 孔板光径， 0.5cm ；

V ---加入提取液体积， 1 mL ；

V_1 ---加入反应体系中样本体积， 0.01mL ；

V_2 ---反应总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr ---丙酮酸分子量， 88.06 ；

W ---样本质量， g ；

500 ---细菌或细胞总数，万。
