

## 丙酮酸（pyruvic acid PA）含量测定试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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，在碱性溶液中呈显色。

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、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体2.5mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体12.5mL×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（10<sup>4</sup>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. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至520nm，蒸馏水调零。

2、在微量石英比色皿或96孔板中加入75μL样本和25μL试剂一，混匀，静置2min，加入125μL试剂二，混匀，于520nm波长处测定管吸光值A。

丙酮酸含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0466x + 0.0675$ ；x为丙酮酸含量（μg/mL），y为吸光值。

2、按照血清（浆）体积计算

丙酮酸含量（μg/mL）=  $[(A - 0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 214.6 \times (A - 0.0675)$

3、按照蛋白浓度计算

丙酮酸含量（μg/mg prot）=  $[(A - 0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 21.46 \times (A - 0.0675) \div Cpr$

4、按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/g鲜重}) = [(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 21.46 \times (A-0.0675) \div W$$

### 3、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g}/104 \text{ cell}) = [(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.043 \times (A-0.0675)$$

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。

### b.用96孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0233x + 0.0675$ ; x为丙酮酸含量( $\mu\text{g/mL}$ ), y为吸光值。

### 2、按照血清(浆)体积计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mL}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 429.2 \times (A-0.0675)$$

### 3、按照蛋白浓度计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 42.92 \times (A-0.0675) \div \text{Cpr}$$

### 4、按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/g鲜重}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 42.92 \times (A-0.0675) \div W$$

### 3、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g}/104 \text{ cell}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.086 \times (A-0.0675)$$

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。

**注意: 最低检测限为 $1\mu\text{g/mL}$ 或 $1\mu\text{g/g鲜重}$ 或 $10\text{ng}/\text{mg prot}$**