

丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（酶法）说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC5260

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 37μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

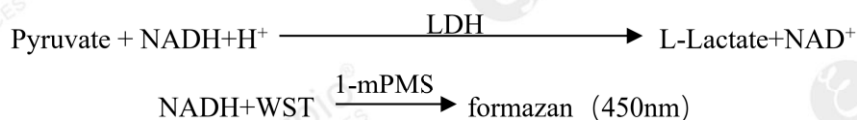
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 3.6mL 蒸馏水充分溶解，分装保存，-20℃可以保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂三：临用前先将液体甩离至管底部（使用掌上离心机即可）；按试剂三：蒸馏水=10μL：1mL（约 13T）的比例进行稀释，现用现配。
- 3、标准品：20 μmol/mL 丙酮酸钠标准液。

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。

在pH = 7.5 时，丙酮酸在LDH的催化作用下与NADH反应，生成NAD⁺和乳酸。在1-mPMS作用下，WST-1可与NADH反应，产生水溶性formazan。通过检测450nm条件下吸光值，可以计算出丙酮酸含量。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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（10⁶ 个）：提取液体积（mL）为 5~10：1 的比例（建议 5 百万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰 上待测。





1. 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。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 血清（浆）等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长到450nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一37℃预热20min以上。
- 3、标准品的制备：将20μmol/mL丙酮酸钠标准液用蒸馏水稀释得到0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125μmol/mL标准溶液备用。
- 4、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	20	50	950	1
2	1	500	500	0.5
3	0.5	500	500	0.25
4	0.25	500	500	0.125
5	0.125	500	500	0.0625
6	0.0625	500	500	0.03125

备注：下述实验中每个标准管需100μL标准溶液（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

5、操作表：(在1.5mL EP管中加入下列试剂)

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液	100	100	-	-
标准品	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
试剂一	775	900	775	775
试剂二	50	-	50	50
试剂三（稀释后）	75	-	75	75
混匀后37℃避光反应30min				
试剂四	100	100	100	100
混匀后 37℃避光反应 30min。吸取 1000μL 于 1mL 玻璃比色皿，测定 450nm 下的吸光度，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{空白}} - A_{\text{标准}}$ 。（标准曲线和空白管只需测 1-2 次即可）				

三、丙酮酸含量计算

1、标准曲线绘制：

根据标准管的浓度（x，μmol/mL）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到x（μmol/mL）。

2、含量计算：

(1) 按液体样本的体积计算



丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = x$

(2) 按组织质量计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W$

(3) 按蛋白浓度计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) = x \div C_{\text{pr}}$

(4) 按细菌/细胞数量计算

丙酮酸含量 ($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times N) = x \div N$

V样: 加入的样本体积, 0.1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; V提: 加入提取液的体积, 1mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞数量, 以百万计。

注意事项:

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者用蒸馏水稀释样本后再进行测定。

实验实例:

- 1、称取约 0.1g 鼠肺, 加入 1mL 提取液, 冰浴研磨, 8000g, 4°C离心 10min, 取上清待测。之后按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 1.122 - (0.678 - 0.299) = 0.743$, 标曲 $y = 1.4748x + 0.0548$, $x = 0.467 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 4.667 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 2、称取约 0.1g 鸢尾, 加入 1mL 提取液, 冰浴研磨, 8000g, 4°C离心 10min, 取上清待测。之后按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 1.122 - (0.572 - 0.203) = 0.753$, 标曲 $y = 1.4748x + 0.0548$, $x = 0.473 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 4.73 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 3、吸取 0.1mL 的马血清, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 1.122 - (1.142 - 0.126) = 0.106$, 标曲 $y = 1.4748x + 0.0548$, $x = 0.035 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = x = 0.035 \mu\text{mol/mL}$ 。
- 4、收集约 500 万细胞, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎 (功率 200w, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 8000g, 4°C离心 10min, 取上清待测。之后按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 1.122 - (0.949 - 0.113) = 0.286$, 标曲 $y = 1.4748x + 0.0548$, $x = 0.157 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
丙酮酸含量 ($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times 5) = 0.2 x = 0.031 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ 。

相关系列产品:

- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒

