

丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（酶法）说明书

微量法

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：BC5265

规格：100T/48S

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 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 13μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

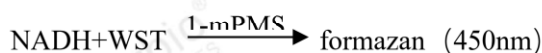
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.2mL 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=1μL：100μL（约 6T）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/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、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。





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。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 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/酶标仪预热30min以上，调节波长到450nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、试剂一37℃预热20min。
- 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1、0.625、0.5、0.3125、0.25、0.15625μmol/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	625	375	0.625
3	0.625	800	200	0.5
4	0.5	625	375	0.3125
5	0.3125	800	200	0.25
6	0.25	625	375	0.15625

备注：实验中每个标准管需20μL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管中依次加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管1	空白管2
上清液	20	20	-	-	
标准品	-	-	20	-	
蒸馏水	-	-	-	20	40
试剂一	155	180	155	155	155
试剂二	10	-	10	10	10
试剂三（稀释后）	15	-	15	15	15
37℃避光反应30min					-
试剂四	20	20	20	20	-

37℃避光反应 30min。吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中，测定 450nm 下的吸光度，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{空白1}} - A_{\text{标准}}$ 。（标准曲线、空白管 1、空白管 2 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、丙酮酸含量计算：

（1）按液体样本的体积计算

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



(2) 按组织质量计算

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

(3) 按蛋白浓度计算

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

(4) 按细菌/细胞数量计算

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

V_样: 加入的样本体积, 0.02mL; C_{pr}: 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 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = (1.156 - 0.045) - (0.595 - 0.271) = 0.787$, 标曲 $y = 0.8502x + 0.0217$, $x = 0.900 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
 $\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 9.00 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 2、称取约 0.1g 鸮尾, 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 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = (1.156 - 0.045) - (0.545 - 0.207) = 0.773$, 标曲 $y = 0.8502x + 0.0217$, $x = 0.884 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
 $\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 8.837 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 3、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 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = (1.156 - 0.045) - (0.770 - 0.098) = 0.439$, 标曲 $y = 0.8502x + 0.0217$, $x = 0.491 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
 $\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times 5) = 0.2 x = 0.098 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ 。
- 4、吸取 0.02mL 的马血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = (1.156 - 0.045) - (1.139 - 0.113) = 0.085$, 标曲 $y = 0.8502x + 0.0217$, $x = 0.074 \mu\text{mol/mL}$, 计算丙酮酸含量得:
 $\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = x = 0.074 \mu\text{mol/mL}$ 。

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

