

丙酮酸（pyruvic acid PA）含量-酶法测定试剂盒说明书

（货号：BP10246F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解； 2. 溶解后-20℃保存 2 周。
试剂三	液体 1 瓶	-20℃保存	1. 临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解， 2. 溶解后仍-20℃保存。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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（ 10^4 ）：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、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂可提前于 25℃下孵育 10min，在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分	测定管
样本	40
试剂一	680
试剂二	40
混匀，25℃下孵育 2min 后于 340nm 下读取 A1	
试剂三	40
混匀（轻轻晃动几下），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。) $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

【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 （相应试剂一减少），或样本制备的时候，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：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 279.6 \times \Delta A \div W$$

2、按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) = 0.559 \times \Delta A$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div V_1 = 279.6 \times \Delta A$$

4、按照蛋白浓度计算：

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) = 279.6 \times \Delta A \div C_{pr}$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ---96 孔板光径，1cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

V_1 ---加入反应体系中样本体积，0.04mL；

V_2 ---反应总体积， $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr ---丙酮酸分子量，88.06；

W ---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 万；

C_{pr} ---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。