

丙酮酸 (pyruvic acid PA) 含量 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10247W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: $0.001-0.7 \mu\text{mol/mL}$

灵敏度: $0.001 \mu\text{mol/mL}$

有效期: 6 个月

保存温度: $2-8^{\circ}\text{C}$

检测原理:

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。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，通过在 520nm 读取吸光值即可得出丙酮酸的含量。本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/41S）	规格（96T/89S）	保存条件
提取液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8℃
试剂一	1.5mL×1 瓶	3mL×1 瓶	2-8℃，避光
试剂二	7.5mL×1 瓶	15mL×1 瓶	2-8℃
标准品	1mL×1 瓶	2mL×1 瓶	2-8℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: $0.001-0.7 \mu\text{mol/mL}$, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为蒸馏水。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 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, 10000 g, 25°C 离心 10min, 取上清待测, 留取部分上清用于蛋白浓度测定。
4. **血清 (浆) 等液体样本**: 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, 10000 g, 25°C 离心 10min, 取上清待测。
5. **细菌和培养细胞样本**: 按照细菌或细胞数量 (10^4 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, 10000 g, 25°C 离心 10min, 取上清待测。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温，
2. **标准品溶液的配制:** 把标准品母液（20 μ mol/mL）用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μ mol/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
标准品浓度(μ mol/mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
20 μ mol/mL 标准品(μ L)	0	5	10	15	20	25	30
蒸馏水(μ L)	1000	995	990	985	980	975	970

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm。
2. 样本测定（在 96 板孔中依次加入）：

试剂名称(μL)	标准孔	测定孔
不同浓度标准品	75	
样本		75
试剂一	25	25
混匀，37℃孵育 10min。		
试剂二	125	125
混匀，室温下静置 5min，在 520nm 波长处读取各孔 OD 值。		

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$

2. 按照血清（浆）体积计算：

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol/mL}) &= [(\Delta A - b) \div a \times V_{\text{反}}] \div (V_{\text{样}} \times V_{\text{反}} \div V_{\text{提取}}) \times N \\ &= (\Delta A - b) \div a \div 0.1 \times N \end{aligned}$$

3. 按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= [(\Delta A - b) \div a \times V_{\text{反}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{反}}) \times N \\ &= (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times N \end{aligned}$$

4. 按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量} (\text{mg/g 鲜重}) &= [(\Delta A - b) \div a \times V_{\text{反}}] \div (W \times V_{\text{反}} \div V_{\text{提取}}) \times N \\ &= (\Delta A - b) \div a \div W \times N \end{aligned}$$

5. 按照细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A - b) \div a \times V_{\text{反}}] \div (500 \times V_{\text{反}} \div V_{\text{提取}}) \times N \\ &= (\Delta A - b) \div a \div 500 \times N \end{aligned}$$

注：

y: 标准品 OD 值-空白孔 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

ΔA : 测定孔 OD 值-空白孔 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

a: 标曲的斜率

W: 样本鲜重, g

b: 标曲的截距

$V_{\text{样}}$: 加入血清（浆）体积, 0.1mL

