

丙酮酸（pyruvic acid PA）含量-2,4-二硝基苯肼比色法测定试剂盒说明书

（货号：BP10247F-48 分光法 48 样 有效期：6 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。

丙酮酸可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙，在碱性溶液中显棕红色；通过在 520nm 读取吸光值即可得出丙酮酸含量。

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 7mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 临用前加 1ml 提取液即为标准品母液，浓度为 20 μmol/mL； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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 比色皿、离心管、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 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至新 EP 管中，置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清液待测。

【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 称取水分充足样本约 0.5g，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至新 EP 管中，由于样本水分较多，可定容为 1.5mL 即 V2，再把样本置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清液待测。

【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

③ 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），转移至新 EP 管中，置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃ 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

④ 液体样品：取液体约 0.5mL 即 V3，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，转移至新 EP 管中，置于冰上孵育 10min 后，12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清液待测。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

② 标准品母液为 20μmol/mL，临用前用提取液稀释 40 倍（如 10μL 标准品+390μL 提取液）：即为 0.5 μmol/mL，待用。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	标准管（仅做一次）	空白管（仅做一次）
样本	70		

标准品		70	
提取液			70
试剂一	140	140	140
混匀, 37°C 孵育 10min			
试剂二	700	700	700
混匀, 室温 (25°C) 5min 后立即于 520nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊, 可以于样本提取时增加样本质量 W (不可改变加样表中样本量 V1), 则改变后的 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

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/g 鲜重}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times Mr \div (W \times V1 \div V) \\ &= 44.03 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

2、按照水分充足样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/g 鲜重}) &= C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V2 \times Mr \div W \\ &= 66.05 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times Mr \div (500 \times V1 \div V) \\ &= 0.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g/mL}) &= C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (V3 + V) \div V3 \times Mr \\ &= 132.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \end{aligned}$$

5、按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V1) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times Mr \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \\ &= 44.03 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

6、按照水分充足样品蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V2 \times Mr \div C_{\text{pr}} \\ &= 66.05 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

C 标准---0.5 $\mu\text{mol/mL}$;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中样品体积, 0.07mL;

V2---液体充分样本定容体积, 1.5mL;

V3---液体样本取样体积, 0.5mL;

Mr---丙酮酸分子量, 88.06;

W---样品质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

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