

## 丙酮酸（pyruvic acid PA）含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

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，在碱性溶液中呈色。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

### 试剂的组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃保存。

### 丙酮酸提取：

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（10<sup>4</sup> 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，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。

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，静置 30min，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。

3、血清（浆）样品：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，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。

#### 测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

2、取 300 μL 样本+100 μL 试剂一于 1.5mL EP 管中，混匀，静置 2min，加入 500 μL 试剂二，混匀，于 520nm 波长处测定管吸光值 A。

#### 丙酮酸含量计算：

1、标准条件下测定回归方程为  $y = 0.0466x + 0.0675$ ； x 为丙酮酸含量（μg/mL），y 为吸光值。

2、按照血清（浆）体积计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mL}) = [(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 214.6 \times (A-0.0675)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/mg prot}) = [(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 21.46 \times (A-0.0675) \div Cpr$$

4、按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g/g 鲜重}) = [(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 21.46 \times (A-0.0675) \div W$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(A-0.0675) \div 0.0466 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.043 \times (A-0.0675)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.3mL； V2：加入提取液体积，1 mL； V3：加入血清（浆）体积，0.1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g； 500：细菌或细胞总数，500 万。

#### 注意：

最低检测限为 1 μg/mL 或 1 μg/g 鲜重或 10ng/mg prot