

丙酮酸 (pyruvic acid PA) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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,在碱性溶液中呈显色。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液:液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一:液体 2.5mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二:液体 12.5mL×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 (10^4 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, 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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 520nm,蒸馏水调零。

2、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 75μL 样本和 25μL 试剂一,混匀,静置 2min,加入 125μL 试剂二,混匀,于 520nm 波长处测定管吸光值 A。

丙酮酸含量计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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

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

3、按照蛋白浓度计算

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

4、按照样品质量计算

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

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, 0.075mL; 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。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0233x + 0.0675$; x 为丙酮酸含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), y 为吸光值。

2、按照血清(浆)体积计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 429.2 \times (A-0.0675)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 42.92 \times (A-0.0675) \div Cpr$$

4、按照样品质量计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 42.92 \times (A-0.0675) \div W$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(A-0.0675) \div 0.0233 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.086 \times (A-0.0675)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.075mL; 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 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 $1\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重或 $10\text{ng}/\text{mg prot}$