

丙酮酸(PA)含量试剂盒(酶法)

(微板法 96 样)

产品简介:

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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4°C保存	临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解; 溶解后-20°C保存 2 周。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解, 溶解后仍-20°C保存。

所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

丙酮酸 (P A) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样

本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 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、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称	测定管
样本	10
试剂一	170
试剂二	10
混匀, 2min 后于 340nm 下读取 A1	
试剂三	10

混匀（轻轻拍打板子几下）,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。） $\Delta A=A1-A2$ 。

【注】:若 ΔA 的值在零附近徘徊,可以增加样本量 V1 (相应的试剂一减少) 或样本制备的时候,增加样本质量 W,则改变后的 V1 或 W 需代入计算公式重新计算。

计算公式:

1、按照样品质量计算:

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 559.1 \times \Delta A \div W$$

2、按照细菌或细胞密度计算:

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) = 1.12 \times \Delta A$$

3、按照液体体积计算:

$$\text{丙酮酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 = 559.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d ---96 孔板光径, 0.5cm;

V ---加入提取液体积, 1 mL; $V1$ ---加入反应体系中样本体积, 0.01mL;

$V2$ ---反应总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; Mr ---丙酮酸分子量, 88.06;

W ---样本质量, g; 500---细菌或细胞总数, 万。