**丙酮酸(pyruvic acid PA)含量测定试剂盒**

 **分光法48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60mL×1瓶 | 4℃保存 |  |
| **试剂一** | 液体40mL×1瓶 | 4℃保存 |  |
| **试剂二** | 粉剂mg×1支 | 4℃保存 | 临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解；溶解后-20℃保存 2 周。 |
| **试剂三** | 粉体mg×1支 | -20℃保存 | 临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解，溶解后仍-20℃保存。 |

**所需的仪器和用品:**

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵、

冰、蒸馏水。

**丙酮酸(PA)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** 组织样本：

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（10⁴）：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** 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

**②** 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称（μL）** | **测定管** |
| **样本** | 40 |
| **试剂一** | 680 |
| **试剂二** | 40 |
| 混匀，2min 后于 340nm 下读取 A1 |
| **试剂三** | 40 |
| 混匀（轻轻晃动几下）, 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。）△A=A1-A2。 |

**[注]：**若△A 的值在零附近徘徊，可以增加样本量 V1（相应试剂一减少），或样本准备

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：**

丙酮酸含量(µg/g 鲜重)= [ΔA÷(ε×d) ×V2×Mr×10⁶]÷(W ×V1÷V) =279.6×ΔA ÷W

**2、按照细菌或细胞密度计：**

丙酮酸含量(μg/10⁴cell)＝[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×10⁶]÷(500×V1÷V) =0.559×ΔA

**3、按照液体体积计算：**

丙酮酸含量(μg/mL)=[ΔA÷(ε×d) ×V2×Mr×10⁶]÷V1=279.6×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.3×10³ L/mol/cm； d---96 孔板光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.04mL；

V2---反应总体积，8×10ˉ⁴ L； Mr---丙酮酸分子量，88.06；

W---样本质量，g； 500---细菌或细胞总数，500 万。