

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：ADS-F-S014-48 分光法 48 样)

一、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。

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 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	临用前加 1ml 提取液即为标准品母液，浓度为 20μmol/mL

三、所需的仪器和用品：

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

四、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 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、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 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：

试剂名称（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℃孵育 10min			
试剂二	700	700	700
混匀，室温（25℃）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，可以于样本制备时增加样本质量 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

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

2、按照水分充足样品质量计算

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

3、按照细菌或细胞密度计算

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

4、按照液体体积计算

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

C 标准---0.5 $\mu\text{mol/mL}$;

V1---反应中样品体积，0.07mL;

V3---液体样本取样体积，0.5mL;

W---样品质量，g;

V---加入提取液体积，1mL;

V2---液体充分样本定容体积，1.5mL;

Mr---丙酮酸分子量，88.06;

500---细菌或细胞总数，500 万。