

丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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（ 10^4 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。
- 2、取 300 μ L 样本+100 μ L 试剂一于 1.5mL EP 管中，混匀，静置 2min，加入 500 μ L 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 (μ g/mL)，y 为吸光值。
- 2、按照血清（浆）体积计算

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

- 3、按照蛋白浓度计算

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

- 4、按照样品质量计算

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

- 5、按照细菌或细胞密度计算

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

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 μ g/mL 或 1 μ g/g 鲜重或 10ng/mg prot