



丙酮酸（PA）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2200

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|--------------|--------|
| 提取液 | 液体 60 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一 | 液体 7 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二 | 液体 30 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准品 | 液体 1 mL×1 支 | 2-8℃保存 |

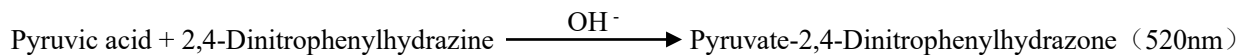
溶液的配制：

- 1、标准品：20μmol/mL丙酮酸钠标准溶液。
- 2、0.125μmol/mL标准溶液的配制：取50μL 20μmol/mL 标准液和450μL蒸馏水混匀，即2μmol/mL 标准液；再取50μL 2μmol/mL 标准液和750μL蒸馏水混匀即配成0.125μmol/mL标准溶液。

产品说明：

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。

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，在碱性溶液中呈樱红色。



技术指标：

最低检出限：0.001 μmol/mL

线性范围：0.0015-0.25 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 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（10⁴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，200W，超声3s，间隔10s，重复30次），静置30min，8000g，常温离心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，常温离心10min，取上清待测。
- 3、血清（浆）样本等液体：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液

体样本加入1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 静置30min, 8000g, 常温离心10min, 取上清待测。

二、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、操作表: (在1.5mL EP管中加入下列试剂)

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|----------------|-----|-----|-----|
| 样本 | 300 | - | - |
| 标准溶液 | - | 300 | - |
| 蒸馏水 | - | - | 300 |
| 试剂一 | 100 | 100 | 100 |
| 充分混匀后常温静置 2min | | | |
| 试剂二 | 500 | 500 | 500 |

充分混匀后于 520nm 波长处测定吸光值, 记为 A 测定管、A 标准管、A 空白管, 计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。空白管和标准管只需做 1-2 次。

三、丙酮酸含量计算

1、按照血清(浆)体积计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{液体}}) \div V_{\text{液体}} = 0.1375 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

2、按照样本蛋白浓度计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol} / \text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

3、按照样本质量计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol} / \text{g 质量}) = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div W = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

4、按照细菌或细胞数量计算

$$\text{丙酮酸含量} (\mu\text{mol} / 10^4 \text{ cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div N = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

C标准: 0.125μmol/mL 标准溶液; V样本: 加入反应体系中样本体积, 0.3mL; V提取: 加入提取液体积, 1mL; V液体: 加入血清(浆)等液体体积, 0.1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以万计。

注意事项:

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
2. 提取液中含有蛋白变性成分, 若使用蛋白浓度计算需要另取样本提取测定。

实验实例:

1. 称取约0.1171g兔肝, 加入1mL提取液, 进行冰浴匀浆, 静置30min, 8000g, 常温离心10min, 取上清待测。之后按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A测定管-A空白管=0.570-0.101=0.469, ΔA 标准=A标准管-A空白管=0.541-0.101=0.440, 计算丙酮酸含量得:

$$PA (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.138 \mu\text{mol/g 质量}$$

2. 称取约0.1094g合欢, 加入1mL提取液, 进行冰浴匀浆, 静置30min, 8000g, 常温离心10min, 取上清用蒸馏水稀释2倍后待测。之后按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A测定管-A空白管=0.886-0.101=0.785, ΔA 标准=A标准管-A空白管=0.541-0.101=0.440, 计算丙酮酸含量得:

$$PA (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times \text{稀释倍数} = 4.077 \mu\text{mol/g 质量}$$

3. 取50 μ L兔血清之后按照测定步骤操作,用1mL玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.146 - 0.101 = 0.045$,
 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.541 - 0.101 = 0.440$, 计算丙酮酸含量得:
 $PA (\mu\text{mol/mL}) = 0.1375 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.014 \mu\text{mol/mL}$

相关发表文献:

- [1] Yao R, Yang Y, Lian S, et al. Effects of acute cold stress on liver O-GlcNAcylation and glycometabolism in mice[J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19(9): 2815.
- [2] Meixi Peng, Dan Yang, Yixuan Hou, et al. Intracellular citrate accumulation by oxidized ATM-mediated metabolism reprogramming via PFKP and CS enhances hypoxic breast cancer cell invasion and metastasis. Cell Death and Disease. March 2019; (IF5.959)
- [3] Xiaofen Fu, Pengsong Li, Lei Zhang, et al. Understanding the stress responses of Kluyveromyces marxianus after an arrest during high-temperature ethanol fermentation based on integration of RNA-Seq and metabolite data. Applied Microbiology and Biotechnology. March 2019; 103(6): 2715-2729. (IF3.67)
- [4] Luo M, Luo Y, Mao N, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer via Connexin 43-Formed Unidirectional Gap Junctional Intercellular Communication. Cellular Physiology and Biochemistry. November 2018

参考文献:

- [1] Venkatesh C, Ramalingam K. Lactic acid, pyruvic acid and lactate/pyruvate ratio in the Anoplocephalid tapeworm *Stilesia globipunctata* infecting sheep (*Ovis aries*) [J]. Veterinary parasitology, 2007, 144(1-2): 176-179.
- [1] Randle W M, Bussard M L, Warnock D F. Ontogeny and Sulfur Fertility Affect Leaf Sulfur in Short-day Onions [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1993, 118(6): 762-765.

相关系列产品:

- BC0740/BC0745 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒
- BC0540/BC0545 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒
- BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒
- BC2250/BC2255 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒