

土壤丙酮酸（S-PA）含量检测试剂盒（酶法）说明书

可见分光光度法

货号：AC17818

规格：50T/24S

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

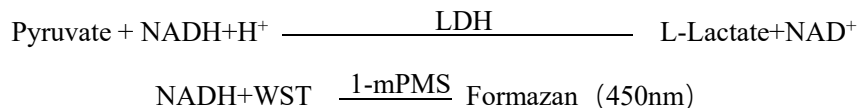
试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 40 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 3.6mL 蒸馏水充分溶解，分装保存，-20℃可以保存 4 周，避免反复冻融。
- 2、试剂三：临用前按试剂三：蒸馏水=10μL：1mL（共 1.01mL，约 13T）的比例进行稀释，现用现配。
- 3、标准品：20μmol/mL 丙酮酸钠标准液。

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。

在pH=7.5时，丙酮酸在LDH的催化作用下与NADH反应，生成NAD⁺和乳酸。在1-mPMS作用下，WST-1可与NADH反应，产生水溶性Formazan。通过检测450nm条件下吸光值，可以计算出丙酮酸含量。**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、离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、1mL玻璃比色皿、研钵、超声清洗仪、30-50目筛和蒸馏水。

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. 新鲜土样自然风干或 37℃烘箱风干，过 30~50 目筛。
2. 称取风干混匀土样约 0.1g，加入 1mL 蒸馏水混匀；然后置于超声清洗仪常温超声 30min。然后 12000g，常温离心 10min，取上清液待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长到450nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一37℃预热20min以上。

3、标准品的制备：将20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠标准液用蒸馏水稀释得到0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液备用。

4、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	20	50	950	1
2	1	500	500	0.5
3	0.5	500	500	0.25
4	0.25	500	500	0.125
5	0.125	500	500	0.0625
6	0.0625	500	500	0.03125

实验中每个标准管需100 μL 标准溶液。

5、操作表：(在1.5mLEP管中加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液	100	100	-	-
标准品	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
试剂一	775	900	775	775
试剂二	50	-	50	50
试剂三	75	-	75	75
混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min				
试剂四	100	100	100	100

混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30min。于 1mL 玻璃比色皿，测定 450nm 下的吸光度，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{空白}} - A_{\text{标准}}$ 。（标准曲线和空白管只需测 1-2 次即可）

三、土壤丙酮酸含量计算

1、标准曲线绘制：

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y , $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2、土壤丙酮酸含量计算：

$$\text{土壤丙酮酸含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W$$

$V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.1mL； $V_{\text{提}}$ ：前处理中加入蒸馏水的体积，1mL； W ：样本质量，g。

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用蒸馏水稀释样本后再进行测定。

实验实例：

1、称取约 0.103g 花盆土，加入 1mL 蒸馏水，超声破碎 30min，10000g，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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 0.843 - (0.493 - 0.028) = 0.378$ ，标曲 $y = 1.4576x - 0.0002$ ， $R^2 = 0.9924$ ， $x = 0.2595 \mu\text{mol/mL}$ ，计算丙酮酸含量得：

$$\text{丙酮酸含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 2.5191 \mu\text{mol/g 质量}。$$

2、称取约 0.101g 污泥，加入 1mL 蒸馏水，超声破碎 30min，10000g，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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = 0.843 - (0.528 - 0.135) = 0.450$ ，标曲 $y = 1.4576x - 0.0002$ ， $R^2 = 0.9924$ ， $x = 0.3089 \mu\text{mol/mL}$ ，计算丙酮酸含量得：

丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 3.0581 \mu\text{mol/g}$ 质量。

相关系列产品：

- AC17832/AC17835 丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒
- AC10140/AC10141 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
- AC10192/AC10193 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
- AC10218/AC10219 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒