

土壤丙酮酸（S-PA）含量检测试剂盒（酶法）说明书

微量法

货号：BC5535

规格：100T/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
试剂一	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 13μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

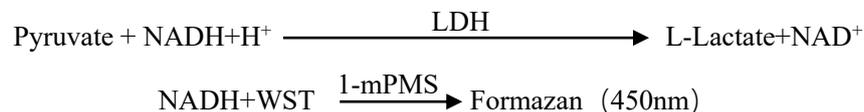
溶液的配制：

- 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=1μL：100μL（共 101μL，约 6T）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/酶标仪、离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、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/酶标仪预热30min以上，调节波长到450nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一37℃至少预热20min。

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0.625、0.5、0.3125、0.25、0.15625、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 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	625	375	0.625
3	0.625	800	200	0.5
4	0.5	625	375	0.3125
5	0.3125	800	200	0.25
6	0.25	625	375	0.15625
7	0.15625	800	200	0.125

实验中每个标准管需20 μL 标准溶液。

5、操作表：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管1	空白管2
上清液	20	20	-	-	
标准品	-	-	20	-	
蒸馏水	-	-	-	20	40
试剂一	155	180	155	155	155
试剂二	10	-	10	10	10
试剂三	15	-	15	15	15
混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min					
试剂四	20	20	20	20	-

混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30min。吸取 200 μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中，测定 450nm 下的吸光度，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{空白1}} - A_{\text{标准}}$ 。（标准曲线、空白管 1、空白管 2 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，0.02mL； $V_{\text{提}}$ ：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 花盆土样，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 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = (0.601 - 0.048) - (0.455 - 0.067) = 0.165$ ，标曲 $y = 0.8017x - 0.0471$ ， $R^2 = 0.9985$ ， $x = 0.265 \mu\text{mol/mL}$ ，计算土壤丙酮酸含量得：

土壤丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 2.573 \mu\text{mol/g}$ 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 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) = (0.601 - 0.048) - (0.331 - 0.07) = 0.292$ ，标曲 $y = 0.8017x - 0.0471$ ， $R^2 = 0.9983$ ， $x = 0.423 \mu\text{mol/mL}$ ，计算土壤丙酮酸含量得：

丙酮酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提}} \times W) = x \div W = 4.188 \mu\text{mol/g}$ 质量。

相关系列产品：

BC5260/BC5265 丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒

BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒

BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒

BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒

