果蝇幼虫脂肪组织丙酮酸 (Pyruvate) 检测 (试剂盒)

Measurement of Pyruvate in *Drosophila* Larvae Adipose Tissue with Commercial Kit

许梦瑶, 黄勋*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京

*通讯作者邮箱: xhuang@genetics.ac.cn

引用格式: 许梦瑶, 黄勋. (2019). 果蝇幼虫脂肪组织丙酮酸 (Pyruvate) 检测 (试剂盒). *Bio-101* e1010284. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010284.

How to cite: Xu, M. Y. and Huang, X. (2019). Measurement of pyruvate in *Drosophila* larvae adipose tissue with commercial kit. *Bio-101* e1010284. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010284. (in Chinese)

摘要: 丙酮酸 (pyruvate) 是糖酵解进入三羧酸循环, 以及糖异生的中心代谢产物, 丙酮酸的水平与一些代谢类疾病相关。本文介绍了一种使用商业化的试剂盒检测果蝇幼虫脂肪组织丙酮酸的方法。

关键词: 脂肪体, 丙酮酸, 能量代谢

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 96 孔板
3. 10 KDa 蛋白 filter (Amicon Ultra centrifugal filters 10K)
4. 果蝇 3 龄幼虫
5. 液氮
6. 丙酮酸检测试剂盒 (Abcam, catalog number: ab65342)
7. Brandford Reagent (Sigma, catalog number: B6916-500ML)
8. BSA (阿拉丁, catalog number: A104912-100g)

仪器设备

1. 移液枪
2. 研磨器 (Koktes)

3. -80 °C 冰箱
4. 酶标仪
5. 离心机 (Eppendorf, model: 5415R)
6. 摇床 (KANGJIAN, model: DSR-22)

实验步骤

1. 样品准备，一组三个重复，每个重复需要 fat body 至少 50 只，解剖时放在冰上，将样品置于 200 μ l 左右的 pyruvate assay buffer 中。样品最好使用新鲜组织，若不能及时完成可以用液氮速冻，置于-80 °C 保存。
2. 将样品在冰上研磨。取 10 μ l 用于测蛋白，其余用于测丙酮酸。
3. 用于测丙酮酸的样品先 4 °C，12,000 $\times$ g 离心 2 min，取上清到 10 KDa 的 filter 去蛋白，4 °C，最大转速离心至少 10 min (10 min 可以得到不能全部过滤，但可以得到大于 100 μ l 的样品)。
4. 同时准备丙酮酸标准样。495 μ l pyruvate assay buffer 加 5 μ l 丙酮酸标准样稀释到 1 nmol/ μ l，再用 1 nmol/ μ l 丙酮酸标准样按下表梯度稀释：0，4，8，12，16，20 μ l 标准样分别加到 100，96，92，88，84，80 μ l pyruvate assay buffer，每孔加 50 μ l 标准样，使得每孔 0，2，4，6，8，10 nmol 丙酮酸。
5. 配制反应液。根据反应数，配制足够的 Mix (反应液为样品数 + 标准样，Blank 为样品数)，每个反应液 50 μ l：
 反应液：46 μ l pyruvate assay buffer + 2 μ l pyruvate probe + 2 μ l enzyme mix
 Blank: 48 μ l pyruvate assay buffer + 2 μ l pyruvate probe
6. 将 50 μ l 标准样 96 孔板，然后加入反应液。将过滤后的样品量 (大于 100 μ l，不够需提前稀释) 加 2 $\times$ 50 μ l 到 96 孔板中，分别加入 50 μ l 反应液与 Blank。
7. 尽量避免气泡，在摇床混匀，室温反应 30 min。检测 OD_{570nm} 值。
8. 同时准备测蛋白。先用 pyruvate assay buffer，配制好 BSA 标准样。先配制浓度大的母液，再稀释 2 mg/ml，1 mg/ml，0.5 mg/ml，0.25 mg/ml，0.125 mg/ml，0 mg/ml，取 10 μ l 反应。
9. 将用于测蛋白的样品用 pyruvate assay buffer 稀释 5 倍，再 4 °C，12,000 $\times$ g，离心 2 min，取 10 μ l 上清加入到 200 μ l Bradford 反应液中，37 °C 反应 10 min。

10. 取 180 μ l 蛋白反应液上清加入 96 孔板，不要有气泡。用酶标仪检测 OD_{595nm} 值。
11. 根据丙酮酸和蛋白质的标准样制作标准曲线，并计算丙酮酸与蛋白量。
12. 本试剂盒也可以根据荧光强度检测丙酮酸，且灵敏度更强，可用更少样品量检测。