

α -酮戊二酸(α -KG)含量检测试剂盒

中文名称： α -酮戊二酸(α -KG)含量检测试剂盒

英文名称： α -Ketoglutaric Acid (α -KG) Content Assay kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 17mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 13 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 1.2 mL×1 支	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

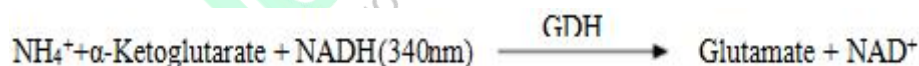
- 1、试剂三：临用前加入 1.3mL 蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 2、试剂四：临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。

3、标准品：临用前加入 0.856mL 蒸馏水充分溶解，配制成 80 μ mol/mL α -酮戊二酸标准溶液， 2-8 $^{\circ}$ C可保存 4 周。

4、试剂四工作液：临用前根据样本量按试剂四：蒸馏水=0.1mL: 0.4mL (共 0.5mL, 50T) 的比例配制，现用现配。

5、400nmol/mL 标准溶液配制：实验前取 50 μ L 的 80 μ mol/mL 标准溶液，加入 950 μ L 蒸馏水充分混合配制成 4 μ mol/mL 标准溶液。再取 100 μ L 4 μ mol/mL 标准溶液和 900 μ L 蒸馏水混合配制成 0.4 μ mol/mL (400nmol/mL) 标准溶液备用。

产品简介： α -酮戊二酸 (α -Ketoglutarate, α -KG) 是三羧酸循环中重要的代谢中间产物，是连接细胞内碳-氮代谢的关键节点。 α -酮戊二酸作为一种短链羧酸分子，是谷氨酰胺、谷氨酸等多种重要的氨基酸的前体，不仅直接参与供能，还参与细胞内多种化学反应，具有多种生理作用。GDH 催化 NH_4^+ 、 α -酮戊二酸和 NADH，生成谷氨酸和 NAD^+ ，引起 340nm 吸光度下降。通过测定 NADH 的变化，计算 α -酮戊二酸含量。



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：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1. 组织：按照质量 (g)：提取液一体积(mL)为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g，加入

1mL 提取液一) 加入提取液一, 冰浴匀浆后于 4°C, 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 4°C 12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞: 按照细胞数量 (10^6 个): 提取液一体积 (mL) 为 5~1: 1 的比例 (建议 5 百万细胞加入 1mL 提取液一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 于 4°C, 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 4°C 12000g 离心 10min 后取上清待测。

3. 液体: 取 100 μ L 液体加入 1mL 提取液一, 4°C 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 12000g 离心 10min 后取上清待测。

注: 提取液二需缓慢加入, 加入后会产生大量气泡, 建议使用 2mLEP 管进行操作。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 紫外分光光度计用蒸馏水调零。

3、在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中按下表步骤加样:

试剂名称(μ L)	测定管	标准管	空白管
样本	60	-	-
标准品	-	60	-
蒸馏水	-	-	60
试剂一	110	110	110
试剂二	10	10	10
试剂三	10	10	10
37°C 预热 5min			
试剂四工作液	10	10	10

充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37°C环境中反应 5min (酶标仪有控温功能可将 温度调至 37°C), 拿出迅速擦干测定 5min20s 时的吸光值 A2 。 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定, ΔA 标准=A1 标准-A2 标准, ΔA 空白=A1 空白-A2 空白。空白管和标准管只需测定 1-2 次。

三、 α -酮戊二酸(α -KG)含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol}/\text{mg prot}) &= C \text{ 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 样} \div \\ &(\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \times F \\ &= 400 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \times F \end{aligned}$$

(2)按样本质量计算

$$\begin{aligned} \alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol}/\text{g 质量}) &= C \text{ 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times (V \text{ 上清} + V \\ &\text{提取液二}) \div (W \times V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) \times F \\ &= 475 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \times F \end{aligned}$$

(3)按细菌或细胞数目计算

$$\begin{aligned} \alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol}/10^6 \text{ cell}) &= C \text{ 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times (V \text{ 上} \\ &\text{清} + V \text{ 提取液二}) \div (N \times V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) \times F \\ &= 475 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div N \times F \end{aligned}$$

(4)按液体体积计算

$$\begin{aligned} \alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol}/\text{mL}) &= C \text{ 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times (V \text{ 上清} + V \\ &\text{提取液二}) \div [V \text{ 液体} \times V \text{ 上清} \div (V \text{ 液体} + V \text{ 提取液一})] \times F \\ &= 5225 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times F \end{aligned}$$

C 标准 : α -酮戊二酸标准溶液浓度, 400 nmol/mL; V 样 : 反应体系中加入的样本体积, 0.06mL; V 上清 : 提取时上清的体积, 0.8mL; V 提取液二: 加入提取液二的体积, 0.15mL; V 提取液一 : 加入提取液一的体积, 1mL; V 液体 : 液体样 本体积, 0.1mL; Cpr: 蛋白

质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞或细菌数目, 以 10^6 计; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 采用 96 孔 UV 板测定时, 如果样本 A1 测定 < A1 空白或 ΔA 测定大于 0.5, 可以用蒸馏水对样本进行稀释或者缩短第二步 37°C 反应时间; 如果 ΔA 测定小于 0.01, 可以加大样本量或者延长第二步 37°C 反应时间。计算时同步修改 计算公式。
2. 采用微量石英比色皿测定时, 如果样本 A1 测定 < A1 空白或 ΔA 测定大于 0.8, 可以用蒸馏水对样本进行稀释或者缩短第二步 37°C 反应时间; 如果 ΔA 测定过小, 可以加大样本量或者延长第二步 37°C 反应时间。计算时同步修改计算公式。
3. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取组织。
4. 温度对该实验影响较大, 务必保持反应温度在 37°C 。

实验实例:

1、称取 0.1066g 小鼠肝脏组织, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板测得计算 ΔA 测定 = A1 测定 - A2 测定 = 0.694 - 0.679 = 0.017, ΔA 标准 = A1 标准 - A2 标准 = 0.594 - 0.307 = 0.287, ΔA 空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.637 - 0.633 = 0.004。带入公式计算:

$\alpha\text{-KG}$ 含量 (nmol/g 质量) = $475 \times \Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F = 204.69 \text{ nmol/g 质量}$