

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：紫外分光光度法

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 60mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
提取液二	液体 9mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂二	液体 4mL×1 支	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存
标准品	粉剂×1 支	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存

溶液的配制：

1、试剂三：临用前加入 3.34mL 蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

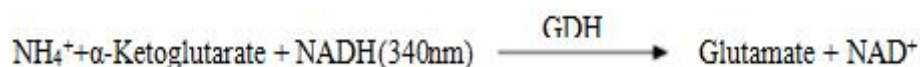
4、试剂四工作液：临用前根据样本量按试剂四：蒸馏水=0.1mL：0.4mL（共 0.5mL，10T）的比例配制，现用现配。

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。

产品说明：

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、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、1mL 石英比色皿、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℃, 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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。

2. 细胞: 按照细胞数量 (10⁶ 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℃, 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℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。

3. 液体: 取 100μL 液体加入 1mL 提取液一, 4℃ 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, 用蒸馏水调零。

3、加样表: (在 1mL 比色皿中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	300	-	-
标准品	-	300	-
蒸馏水	-	-	300
试剂一	550	550	550
试剂二	50	50	50



试剂三	50	50	
37℃预热 5min (建议使用水浴锅或金属浴预热)			
试剂四工作液	50	50	50
加入试剂四工作液后立即充分混匀, 于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37℃环境中反应 5min, 拿出迅速擦干测定 5min20s 时的吸光值 A2, 记录 340nm 下 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 的吸光值 A2。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A1_{\text{标准}} - A2_{\text{标准}}$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ 。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

$$\begin{aligned} \alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol/mg prot}) &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样}} \\ &\div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \times F \\ &= 400 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

(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

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

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,

0.3mL; 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 106 计; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 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 测定小于 0.01, 可以加大样本量或者延长第二步 37°C 反应时间。最终计算时同步修改计算公式。
2. 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。
3. 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:

称取 0.1066g 小鼠肝脏组织进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用 1mL 石英比色皿测得
计算 ΔA 测定 = A1 测定 - A2 测定 = 1.201 - 1.175 = 0.026, ΔA 标准 = A1 标准 - A2 标准
= 1.015 - 0.487 = 0.528, ΔA 空白 = A1 空白 - A2 空白 = 1.080 - 1.074 = 0.006。

带入公式计算:

$$\begin{aligned}\alpha\text{-KG 含量 (nmol/g 质量)} &= 475 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \times F \\ &= 170.72 \text{ nmol/g 质量}\end{aligned}$$