

α-酮戊二酸(α-Ketoglutarate, α-KG)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10399W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

α-酮戊二酸 (α-ketoglutarate, α-KG) 是三羧酸循环中的一个重要物质, 在循环中的位置为异柠檬酸之后和琥珀酰辅酶 A 之前, 连接细胞内碳-氮代谢, 不仅直接参与机体的氧化供能, 还参与体内多种物质的化学合成, 其对机体维持正常生理功能有重要作用。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测α-酮戊二酸的方法, 利用谷丙转氨酶使α-酮戊二酸转化为谷氨酸, 通过谷氨酸脱氢酶进一步检测谷氨酸含量, 同时使生成的 NADH 进一步与显色剂反应生成黄色物质, 通过检测该有色物质在 450nm 处的生成量即可得出α-酮戊二酸的含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 1 支	4℃避光保存	
试剂五	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水充分溶解; 3. 每次用前需再次摇匀使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织样本(水分含量高的样本建议取 0.5g 左右), 加 1mL 提取液冰浴研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 4℃离心 10min, 上清液待测。

②液体样品: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

③ 细胞/细菌样本:

先收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3S，间隔 10S，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 450nm。
- ② 标准品的制备：临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解，即为标准品母液，且浓度为 $5\mu\text{mol/mL}$ ，再稀释 100 倍（如 $10\mu\text{L}$ 标准品母液+990 μL 蒸馏水），即得待测标准品浓度为 $0.05\mu\text{mol/mL}$ 的 α -酮戊二酸。
- ③ 所有试剂需解冻至室温(25℃)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)	测定管	对照管
样本			20	20
标准品	20			
试剂一	10	10	10	
试剂二	10	10	10	10
试剂三	10	10	10	10
试剂四	10	10	10	10
试剂五	130	150	130	150
试剂六	10	10	10	
混匀，37℃条件下，避光反应 30min，于 450nm 下读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。				

【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以增加样本加样量 V_1 （如增至 $40\mu\text{L}$ ，则试剂五相应减少），或增加样本取样量 W （如取样 0.2g），则改变后的 V_1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若样本中 α -酮戊二酸含量过高， A 测定值超过 1，则可对样本用蒸馏水或提取液进行稀释后再按照加样表测定，则稀释倍数 D 需代入计算公式计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\text{nmol/L/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D$$

$$= 50 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times Mr \times D$$

$$= 7.305 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按样本蛋白浓度计算：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\text{nmol/L/g prot}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \times D$$

$$= 50 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}((\mu\text{g/g prot})) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \times Mr \times D$$

$$= 7.305 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\text{nmol/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D$$

$$= 50 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\mu\text{g/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times Mr \times D$$

$$= 7.305 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

4、按细菌/细胞密度计算：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})(\text{nmol}/10^4\text{cell})=(C\text{ 标准}\times V\text{ 标准})\times\Delta A\div(A\text{ 标准}-A\text{ 空白})\div(\text{细胞数量}\times V1\div V)\times D$$
$$=50\times\Delta A\div(A\text{ 标准}-A\text{ 空白})\div\text{细胞数量}\times D$$

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})(\mu\text{g}/10^4\text{cell})=(C\text{ 标准}\times V\text{ 标准})\times\Delta A\div(A\text{ 标准}-A\text{ 空白})\div(\text{细胞数量}\times V1\div V)\times Mr\times D$$
$$=7.305\times\Delta A\div(A\text{ 标准}-A\text{ 空白})\div\text{细胞数量}\times D$$

C 标准---0.05 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ =50nmol/mL;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

V 标准---0.02mL;

W---样本质量, g;

 α -酮戊二酸(α -KG)分子量 Mr---146.1;

细胞数量---万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。