



## $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)含量检测试剂盒(微量法)

中文名称： $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)含量检测试剂盒

英文名称： $\alpha$ -Ketoglutaric Acid ( $\alpha$ -KG) Content Assay kit

产品包装：盒装

产品推荐：若使用 96 孔板测定，需使用 96 孔 UV 板

产品规格：100T/96S

储存条件： $-20^{\circ}\text{C}$

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 $^{\circ}\text{C}$ 保存
提取液二	液体 17mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂一	液体 13 mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂二	液体 1.2 mL×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 支	-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 1.3mL 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。

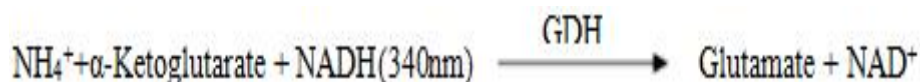


- 2、试剂四：临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 3、标准品：临用前加入 0.856mL 蒸馏水充分溶解，配制成 80μmol/mL α-酮戊二酸标准溶液，2-8℃可保存 4 周。
- 4、试剂四工作液：临用前根据样本量按试剂四：蒸馏水=0.1mL：0.4mL（共 0.5mL，50T）的比例配制，现用现配。
- 5、400nmol/mL 标准溶液配制：实验前取 50μL 的 80μmol/mL 标准溶液，加入 950μL 蒸馏水充分混合配制成 4μmol/mL 标准溶液。再取 100μL 4μmol/mL 标准溶液和 900μL 蒸馏水混合配制成 0.4μmol/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  $\text{NH}_4^+$ 、α-酮戊二酸和 NADH，生成谷氨酸和  $\text{NAD}^+$ ，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

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 (10<sup>6</sup>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，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(μL)	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 。 $\Delta A$ 测定=A1 测定-A2 测定, $\Delta A$ 标准=A1 标准-A2 标准, $\Delta A$ 空白=A1 空白-A2 空白。空白管和标准管只需测定 1-2 次。			

### 三、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)含量计算

#### (1) 按样本蛋白浓度计算

$$\alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol}/\text{mg prot}) = C \text{ 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 样} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \times F$$

$$= 400 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div C_{pr} \times F$$

#### (2)按样本质量计算

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

$$= 475 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \times F$$

#### (3)按细菌或细胞数目计算

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

$$= 475 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div N \times F$$

#### (4)按液体体积计算

$$\alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol}/\text{mL}) = C \text{ 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times (V \text{ 上清} + V$$



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

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<sup>6</sup> 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 Δ 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：

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