

## $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -Ketoglutarate, $\alpha$ -KG)含量测定试剂盒说明书

(货号: G0861W 微板法 48 样)

### 一、产品简介:

$\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸的方法,利用谷丙转氨酶使 $\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸的含量。

### 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格             | 保存要求   | 备注                                             |
|------|----------------|--------|------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶    | 4℃保存   |                                                |
| 试剂一  | 粉体 mg×1 支      | 4℃保存   | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用。             |
| 试剂二  | 粉体 mg×1 支      | 4℃保存   | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。             |
| 试剂三  | 粉体 mg×1 支      | -20℃保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。             |
| 试剂四  | 液体 mL×1 支      | 4℃保存   |                                                |
| 试剂五  | 液体 16mL×1 瓶    | 4℃保存   |                                                |
| 试剂六  | 液体 $\mu$ L×1 支 | -20℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,再加入 0.55mL 蒸馏水充分溶解。每次使用前需再次摇匀使用。 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支      | 4℃保存   |                                                |

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

### 四、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### 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 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。

③ 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。

#### 2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，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 20 $\mu$ mol/mL，再稀释 400 倍（如 5 $\mu$ L 标准品母液+1995 $\mu$ L 蒸馏水），即得待测标准品浓度为 0.05 $\mu$ mol/mL 的 $\alpha$ -酮戊二酸。
- ③ 所有试剂需解冻至室温(25 $^{\circ}$ C)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称 ( $\mu$ L) | 标准管<br>(仅做一次) | 空白管<br>(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 $^{\circ}$ C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 $\Delta A$ 在零附近徘徊，可以增加样本加样量 V1（如增至 40 $\mu$ 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 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本中 $\alpha$ -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：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\text{nmol/L/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times D$$

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

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times Mr \times D$$

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

### 2、按细菌/细胞密度计算：

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

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

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

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

### 3、按照液体体积计算：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})\text{含量}(\text{nmol/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D$$

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

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

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

C 标准---0.05 $\mu$ mol/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；

$\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)分子量 Mr---146.1；

细胞数量---万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。