

α -酮戊二酸 (α -KG) 含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC17956

规格：100T/96S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 17 mL×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

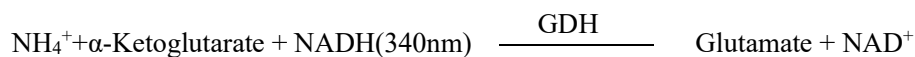
溶液的配制：

- 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 -酮戊二酸标准品，2-8°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：0.15mL（共 0.25mL，25T）的比例配制，现用现配。
- 5、400nmol/mL 标准品配制：实验前取 50 μ L 的 80 μ mol/mL 标准品，加入 950 μ L 蒸馏水充分混合配制成 4 μ mol/mL 标准品。再取 100 μ L 4 μ mol/mL 标准品和 900 μ L 蒸馏水混合配制成 0.4 μ mol/mL（400nmol/mL）标准品备用。

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。

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，具体比例可以参考文献）

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2mL EP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。
- 2、临用前根据样本量取部分试剂一置于 37℃预热 10min 以上。
- 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
试剂四工作液	10	10	10

加入试剂四工作液后立即充分混匀，于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃环境中反应 30min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃），拿出迅速擦干测定 30min10s 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。

注：样本量较多时，可将试剂一：试剂二：试剂三=110μL：10μL：10μL（共 130μL，1T）混成工作液置于 37℃预热后使用，注意按样本量现配现用。

三、α-酮戊二酸（α-KG）含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(3) 按细菌或细胞数目计算

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

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

(4) 按液体体积计算

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

$$= 5225 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times F$$

$C_{\text{标准}}$: α -酮戊二酸标准品浓度, 400 nmol/mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.06mL; $V_{\text{上清}}$: 提取时上清的体积, 0.8mL; $V_{\text{提取液二}}$: 加入提取液二的体积, 0.15mL; $V_{\text{提取液一}}$: 加入提取液一的体积, 1mL; $V_{\text{液体}}$: 液体样本体积, 0.1mL; C_{pr} : 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 $A1_{\text{测定}} < A1_{\text{空白}}$ 或 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.6$, 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 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$, 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:

1、称取 0.1037g 大鼠肝脏组织进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 0.805 - 0.763 = 0.042$, $\Delta A_{\text{标准}} = A1_{\text{标准}} - A2_{\text{标准}} = 0.714 - 0.341 = 0.373$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.757 - 0.753 = 0.004$ 。带入公式计算:

$$\alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol/g 质量}) = 475 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F = 471.71 \text{ nmol/g 质量}$$

2、取 100 μ L 牛血清进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 0.776 - 0.747 = 0.029$, $\Delta A_{\text{标准}} = A1_{\text{标准}} - A2_{\text{标准}} = 0.714 - 0.341 = 0.373$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.757 - 0.753 = 0.004$ 。带入公式计算:

$$\alpha\text{-KG 含量}(\text{nmol/mL}) = 5225 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times F = 354.00 \text{ nmol/mL}$$

参考文献:

[1] Azmi N E, Ahmad M, Abdullah J, et al. Biosensor based on glutamate dehydrogenase immobilized in chitosan for the determination of ammonium in water samples[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 388(1):28-32.

[2] Fei Ding, Qiannan Hu, Meiling Wang, et al. Knockout of SISBPASE Suppresses Carbon Assimilation and Alters Nitrogen Metabolism in Tomato Plants. International Journal of Molecular Sciences. December 2018;(IF4.183)

[3] Lin Y, Nan J, Shen J, et al. Canagliflozin impairs blood reperfusion of ischaemic lower limb partially by inhibiting the retention and paracrine function of bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. EBioMedicine, 2020, 52: 102637

相关系列产品:

- AC10192/AC10193 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
- AC10222/AC10223 乙酰辅酶A含量检测试剂盒
- AC10392/AC10394 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒
- AC17824/AC17879 苹果酸含量检测试剂盒