

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

(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°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C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°C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°C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°C保存	
试剂五	液体 16mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	液体 $\mu$ L×1 支	-20°C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°C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°C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°C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 5 $\mu$ mol/mL，再稀释 100 倍（如 10 $\mu$ L 标准品母液+990 $\mu$ 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 (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 $^{\circ}$ 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：

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

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

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

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

### 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：

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

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

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

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

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。