

α-Ketoglutaric Acid (α-KG) Content Assay Kit

α-酮戊二酸(α-KG)含量测定试剂盒(可见显色法) 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL1816A	α-酮戊二酸(α-KG)含量测定试剂盒(可见显色法) 分光法	24T

产品简介:

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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉末×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉末×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.7mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	粉末×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.7mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体×1 支	4°C保存	
试剂五	30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	液体×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 0.85mL 蒸馏水充分溶解备用。每次用前需再次摇匀使用。
标准品	粉末×1 支	4°C保存	

使用方法:

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!

一、样本准备

1. 组织样本:

- (a) 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;
- (b) 粗提液全部转移到离心管中, 12000rpm, 4°C离心 10min, 上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

2. 细胞/细菌样本:

- (a) 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;
- (b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);
- (c) 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



【注】：若增加样本量，按照每 $0.5\sim 1\times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

3. 液体样本：

直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

二、样品测定

1. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
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 $20\mu\text{mol/mL}$ ，再稀释 400 倍（如 $5\mu\text{L}$ 标准品母液+ $1995\mu\text{L}$ 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°C)。
4. 在离心管中依次加入：

试剂名称 (μL)	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)	测定管	对照管
样本	-	-	70	70
标准品	70	-	-	-
试剂一	30	30	30	-
试剂二	30	30	30	30
试剂三	30	30	30	30
试剂四	30	30	30	30
试剂五	520	590	520	580
试剂六	30	30	30	-

混匀， 37°C 条件下，避光反应 30min，转移所有试剂至 1mL 玻璃比色皿中，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 $120\mu\text{L}$ ，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 1.2，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。

三、结果计算

1. 按照样本质量计算：

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

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

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

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

2. 按细菌/细胞密度计算：

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \times D$$

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

$$\alpha\text{-酮戊二酸}(\alpha\text{-KG})(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \times Mr \times D$$

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

3. 按照液体体积计算：

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

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

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

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

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
 注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



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

V1---加入反应体系中样本体积, 0.07mL

W---样本鲜重, g

D---稀释倍数, 未稀释即为 1

V---加入提取液体积, 1 mL

V 标准---0.07mL

细胞数量---万

α -酮戊二酸(α -KG)分子量 Mr---146.1

注意事项:

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C保存六个月。

