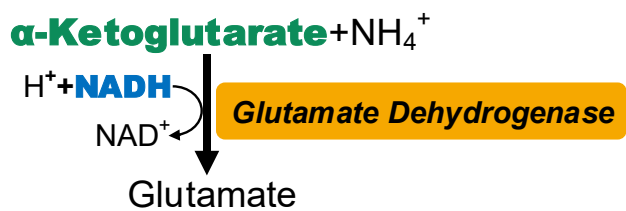




α -酮戊二酸 (α -KG) 含量检测试剂盒

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



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



α -酮戊二酸 (α -KG) 含量检测试剂盒 **α -Ketoglutaric Acid (α -KG) Content Assay Kit****一、产品描述**

α -酮戊二酸 (α -Ketoglutarate, α -KG) 是一种在生物体内代谢中发挥重要作用的有机酸, 也是合成糖类、氨基酸以及蛋白质等物质的重要前体, 作为动植物体内三羧酸循环的关键中间代谢产物参与氨基酸、维生素和有机酸的合成及能量代谢, 在饲料、化工、化妆品等行业具有广泛应用。

谷氨酸脱氢酶 (GDH) 能够催化 NH_4^+ 、 α -酮戊二酸和 NADH, 生成谷氨酸和 NAD^+ , NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可定量检测 α -酮戊二酸的含量。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A		液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B		液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一		液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二		液体 1.5 mL×1 支	4°C 保存	-
试剂三	组分 A	粉剂×1 支	4°C 避光保存	使用前组分 A 加入 1.5 mL 组分 B 充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
	组分 B	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四		粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 800 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
标准品		粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 900 μL 蒸馏水充分溶解 (即为 80 $\mu\text{mol/mL}$ α -酮戊二酸标准液)
标准应用液的制备 (现用现配): 使用前将 80 $\mu\text{mol/mL}$ α -酮戊二酸标准液使用蒸馏水稀释至 0.4 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准应用液。				

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 酶标仪、96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样品量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：吸取 100 μL 液体样本加入 1 mL 提取液 A，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

注：提取液 B 加入时会产生大量气泡，应缓慢加入并吹打混匀至无气泡产生，建议使用 2 mL 离心管。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm。

②试剂四应用液的制备（现用现配）：使用前根据使用量按试剂四：蒸馏水=2:3 的体积比配制。

③在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
待测样本	60	-	-
标准应用液	-	60	-
蒸馏水	-	-	60
试剂一	110	110	110
试剂二	10	10	10
试剂三	10	10	10
试剂四应用液	10	10	10

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定、A1 标准和 A1 空白；②37℃准确反应 30 min，测定 30 min 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定、A2 标准和 A2 空白；③计算 A 测定=A1 测定-A2 测定，A 标准=A1 标准-A2 标准，A 空白=A1 空白-A2 空白， ΔA 测定=A 测定-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：标准组和空白组只需测定 1-2 次。

3. α -酮戊二酸 (α -KG) 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\alpha\text{-酮戊二酸含量 (nmol/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times (V_1 + V_2) \times V_3 \times 10^3}{C_{\text{pr}} \times W \times V_1 \times \Delta A_{\text{标准}}} = \frac{475 \times \Delta A_{\text{测定}}}{C_{\text{pr}} \times W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

②按组织样本质量计算

$$\alpha\text{-酮戊二酸含量 (nmol/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times (V_1 + V_2) \times V_3 \times 10^3}{W \times \Delta A_{\text{标准}} \times V_1} = \frac{475 \times \Delta A_{\text{测定}}}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\alpha\text{-酮戊二酸含量 (nmol/10}^4\text{ cell)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times (V_1 + V_2) \times V_3 \times 10^3}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}} \times V_1} = \frac{475 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

④按液体样本体积计算

$$\alpha\text{-酮戊二酸含量 (nmol/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times (V_1 + V_2) \times (V_3 + V_4) \times 10^3}{V_1 \times V_4 \times \Delta A_{\text{标准}}} = \frac{5225 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

注释：C 标：标准应用液浓度，0.4 $\mu\text{mol/mL}$ ；V1：提取过程中吸取上清液的体积，0.8 mL；V2：提取过程中加入提取液 B 体积，0.15 mL；V3：提取过程中加入提取液 A 的体积，1 mL；V4：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/g；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可； 10^3 ：单位换算系数，1 $\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

四、注意事项

①提取液中含有蛋白沉淀组分，待测样本不能用于蛋白含量测定；若使用蛋白浓度计算 α -酮戊二酸含量，则需要另取样本使用 PBS 或生理盐水按照相同步骤制备为待测样本，再进行蛋白浓度测定；

②准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若同时测定多个样本时，应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；

③若 ΔA 测定大于 0.5，建议将待测样本使用蒸馏水适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间（37°C 准确反应 30 min，可以延长至 60 min）或制备更高浓度的样本后再进行测定，计算时相应修改；

④若吸光值超过 3.0，建议检查是否为 96 孔 UV 板，96 孔板会因材质造成吸光值超出设备量程；

⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

