



α -酮戊二酸(α -KG)含量试剂盒(可见显色法)

可见分光光度法

货号: R45032-24S

产品简介:

α -酮戊二酸 (a-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。

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30mL×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1mL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1.7mL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1.7mL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30mL×1瓶	4℃保存	
试剂六	液体 μ L×1支	-20℃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。 每次用前需再次摇匀使用。
标准品	粉体mg×1支	4℃保存	

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。



α -酮戊二酸(α -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 $20\mu\text{mol/mL}$, 再稀释400倍(如5 μL 标准品母液+1995 μL 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℃)。

④在EP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℃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)。				

结果计算:

1、按照样本质量计算:

α -酮戊二酸(α -KG)含量(nmol/g 鲜重)

$$= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D$$

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

α -酮戊二酸(α -KG)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:

α -酮戊二酸(α -KG)(nmol/ 10^4 cell)

$$= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \times D$$

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

α -酮戊二酸(α -KG)($\mu\text{g}/10^4$ 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:

α -酮戊二酸(α -KG)含量(nmol/mL)

$$= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D$$

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

α -酮戊二酸(α -KG)含量($\mu\text{g/mL}$)

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

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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V1--- 加入反应体系中样本体积, 0.07mL;

V 标准---0.07mL;

W--- 样本质量, g;

α -酮戊二酸(α -KG) 分子量M---146.1;

细胞数量---万;

D--- 稀释倍数, 未稀释即为1。



源叶