

CheKine™ α -酮戊二酸 (α -KG) 含量检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1241

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 25-1000 nmol/mL		灵敏度: 25 nmol/mL
	适用样本: 动植物组织、细菌、细胞、真菌、血清 (浆)、尿液、细胞培养上清		
	保质期: 4℃, 避光保存 12 个月		

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是谷氨酸脱氢酶 (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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer I	60 mL	120 mL	4℃
Extraction Buffer II	9 mL	18 mL	4℃
Reagent I	10 mL	20 mL	4℃
Reagent II	1.2 mL	2.4 mL	4℃, 避光保存
Reagent III	0.6 mL	1.2 mL	4℃, 避光保存
Standard	400 μ L	400 μ L	4℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS/去离子水	清洗样本用/稀释标准品用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。因 Extraction Buffer I 和 Extraction Buffer II 含有使蛋白变性的成分，若按蛋白浓度计算时，需要重新提取蛋白进行测定。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer I	即用型	4℃保存
Extraction Buffer II	即用型	4℃保存
Reagent I	即用型；使用前置于 37℃ 预热 10 min	4℃保存
Reagent II	即用型	实验过程中冰上放置；4℃避光保存； Reagent II 禁止冷冻
Reagent III	即用型	实验过程中冰上放置；4℃避光保存
Standard	即用型；使用前，平衡到室温	80 μmol/mL α-酮戊二酸 Standard; 4℃保存
400 nmol/mL Standard	临用前配制；取 10 μL 80 μmol/mL Standard，加入 190 μL 去离子水混匀稀释，即得 4 μmol/mL Standard；取 40 μL 4 μmol/mL Standard，加入 360 μL 去离子水混匀稀释，即得 400 nmol/mL Standard	每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4 h 之内使用

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在4 h内完成样品解冻。

- **动植物组织**：称取约0.1 g组织样本，加入1 mL Extraction Buffer I，冰浴匀浆，12000 g，4℃离心10 min，取800 μL上清液，加入150 μL Extraction Buffer II混匀待测。
- **细胞、细菌或真菌**：收集 5×10^6 个细胞、细菌或真菌，用冷PBS清洗细胞、细菌或真菌，800 g离心2 min，弃上清液。加入1 mL Extraction Buffer I，冰浴超声波破碎细胞、细菌或真菌5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次），12000 g，4℃离心10 min，取800 μL上清液，加入150 μL Extraction Buffer II混匀待测。
- **血清（浆）、尿液等液体样本**：取100 μL样本，加入1 mL Extraction Buffer I混匀，12000 g，4℃离心10 min，取800 μL上清液，加入150 μL Extraction Buffer II混匀待测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热30 min以上，调节波长到340 nm。
2. **Working Reagent的配制**：临用前配制；按照每孔配制160 μL Working Reagent，现用现配。吸取130 μL预热的Reagent I、20 μL Reagent II、10 μL Reagent III混匀，配制体积比13:2:1。
3. **检测体系配制**：在96孔UV板中按照如下方式操作。

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)
去离子水	40	0	0
400 nmol/ mL Standard	0	40	0
样本	0	0	40
Working Reagent	160	160	160

4. **吸光度检测**：加入Working Reagent立即混匀读取340 nm处0 min时的吸光值 A_1 和37℃孵育20 min时的吸光值 A_2 。记录空白孔吸光值为 $A_{\text{空白}}$ ，标准孔吸光值为 $A_{\text{标准}}$ ，测定孔吸光值为 $A_{\text{测定}}$ 。空白孔和标准孔仅需检测37℃孵育20 min时的吸光值 A_2 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{1\text{测定}} - A_{2\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{2\text{空白}} - A_{2\text{标准}}$ 。

2. α-KG含量的计算：

- 按样本质量计算：

$$\alpha\text{-KG (nmol/g)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提II}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提I}}) \times n = 475 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times n$$

- 按细胞、细菌或真菌数量计算

$$\alpha\text{-KG (nmol/10}^4\text{)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提II}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提I}}) \times n = 475 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times n$$

● 按液体体积计算

$$\alpha\text{-KG (nmol/mL)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提II}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{液体}} + V_{\text{提I}})] \times n = 5225 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times n$$

● 按蛋白浓度计算

$$\alpha\text{-KG (nmol/mg prot)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times n = 400 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times n$$

$C_{\text{标准}}$: α -KG 标准品浓度, 400 nmol/mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.04 mL; $V_{\text{上清}}$: 提取时上清的体积, 0.8 mL; $V_{\text{提I}}$: 加入 Extraction Buffer I 的体积, 1 mL; $V_{\text{提II}}$: 加入 Extraction Buffer II 的体积, 0.15 mL; $V_{\text{液体}}$: 液体样本的体积, 0.1 mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; N : 细胞、细菌或真菌数量, 以 10^4 为单位 (例如细胞数量为 5×10^6 , $N=500$); n : 样本稀释倍数。

07 结果展示

示例 -1: 取大鼠尿液, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{1\text{测定}} - A_{2\text{测定}} = 1.2917 - 0.9878 = 0.3039$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{2\text{空白}} - A_{2\text{标准}} = 1.0147 - 0.7626 = 0.2521$ 。按液体体积计算得: $\alpha\text{-KG (nmol/mL)} = 5225 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times n = 6298.6 \text{ nmol/mL}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办?

如果样本 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.6$, 需用去离子水适当稀释, 计算结果乘以稀释倍数, 或减少提取用样本量。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$, 可适当提高样本量, 或延长反应时间 (不超过 50 min)。

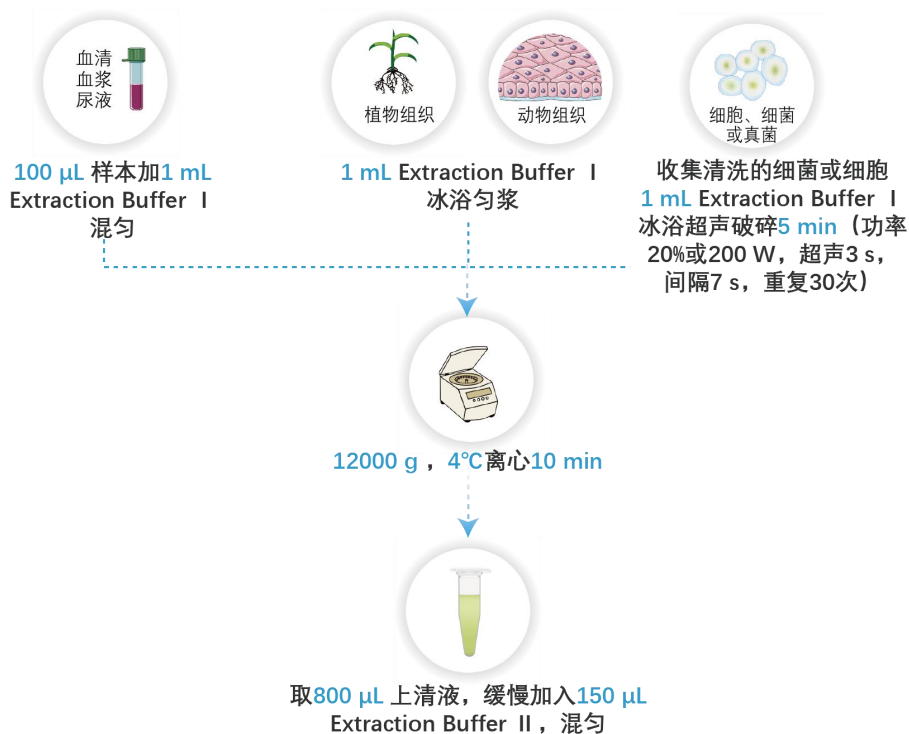
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1260	CheKine™ 乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1240	CheKine™ α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1028	CheKine™ 苹果酸含量检测试剂盒 (微量法)

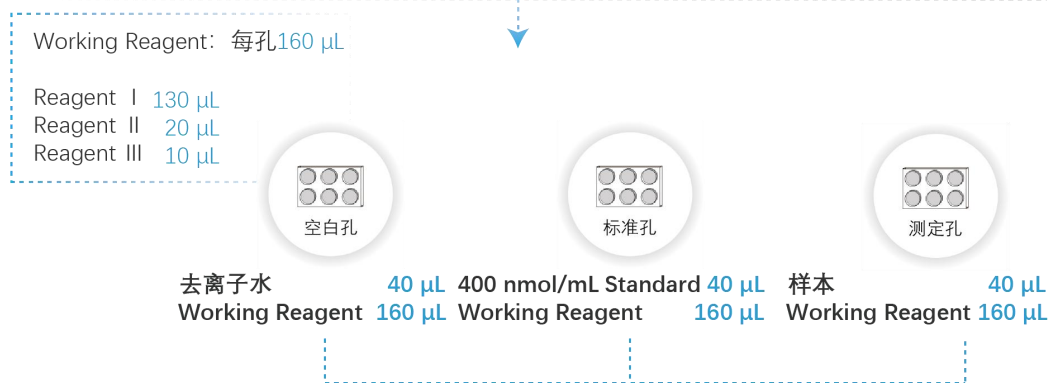
CheKine™ α -酮戊二酸 (α -KG) 含量检测流程示意图

(AbbKine 货号: KTB1241)

样本处理



体系配置



数据检测

立即混匀, 读取 340 nm 处 0 min 时的吸光值 A1
和 37°C 孵育 20 min 时的吸光值 A2
空白孔和标准孔仅需检测吸光值 A2

