

α-酮戊二酸 (α-KG) 含量检测试剂盒 (微量法)

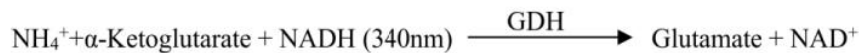
产品货号: BA2080

产品规格: 100T/96S

产品简介:

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。

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。



注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体17mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体13mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体1.2mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂三: 临用前加入1.3mL蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20℃分装保存4周,避免反复冻融。
2. 试剂四: 临用前加入0.5mL蒸馏水充分溶解。未用完的试剂-20℃分装保存4周,避免反复冻融。
3. 试剂四工作液: 临用前根据样本量按试剂四: 蒸馏水=0.1mL:0.15mL(共0.25mL, 25T)的比例配制,现用现配。
4. 标准品: 临用前加入0.856mL蒸馏水充分溶解,配制成80μmol/mL α-酮戊二酸标准品, 2-8℃可保存4周。
5. 400nmol/mL标准品配制: 实验前取50μL的80μmol/mL标准品,加入950μL蒸馏水充分混合配制成4μmol/mL标准品。再取100μL 4μmol/mL标准品和900μL蒸馏水混合配制成0.4μmol/mL(400nmol/mL)标准品备用。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、 样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 组织: 按照质量(g): 提取液一体积(mL) 1:5~10比例(建议称取0.1g样本,加入1mL提取液一)加入提取液一,冰浴匀浆后于4℃,12000g离心10min,取0.8mL上清液,再缓慢加入0.15mL提取液二,缓慢吹打混匀至无气泡产生,4℃12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞: 按照细胞数量(10^6 个): 提取液一体积(mL) 5~10:1的比例(建议5百万细胞加入1mL提取液一),冰浴超声波破碎细胞(功率300W,超声3s,间隔7s,总时间3min),于4℃,12000g离心10min,取0.8mL上清液,再缓慢加入0.15mL提取液二,缓慢吹打混匀至无气泡产生,4℃12000g离心10min后取上清待测。
3. 液体样本: 取100μL液体加入1mL提取液一,4℃,12000g离心10min,取0.8mL上清液,再缓慢加入0.15mL提取液二,缓慢吹打混匀至无气泡产生,12000g离心10min后取上清待测。

注: 提取液二需缓慢加入,加入后会产生大量气泡,建议使用2mL EP管进行操作。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，紫外分光光度计用蒸馏水调零。
2. 临用前根据样本量取部分试剂一置于 37°C 预热 10min 以上。
3. 加样表：（在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	60	-	-
标准品	-	60	-
蒸馏水	-	-	60
试剂一	110	110	110
试剂二	10	10	10
试剂三	10	10	10
试剂四工作液	10	10	10

加入试剂四工作液后立即充分混匀,于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37°C 环境中反应 30min, 拿出迅速擦干测定 30min10s 时的吸光值 A2, 记录 340nm 下 10s 时吸光值 A1 和 30min10s 的吸光值 A2。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A1_{\text{标准}} - A2_{\text{标准}}$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ 。空白管和标准管只需测定 1-2 次。
注: 样本量较多时, 可将试剂一: 试剂二: 试剂三=110μL: 10μL: 10μL(共 130μL, 1T)混成工作液置于 37°C 预热后使用, 注意按样本量现配现用。

三、α-酮戊二酸 (α-KG) 含量计算

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$= 400 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

2. 按样本质量计算

$$\alpha\text{-KG 含量 (nmol/g 质量)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F$$

$$= 475 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times F$$

3. 按细菌/细胞数目计算

$$\alpha\text{-KG 含量 (nmol/10}^6\text{ cell)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F$$

$$= 475 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div N \times F$$

4. 按液体体积计算

$$\alpha\text{-KG 含量 (nmol/mL)} = C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{液体}} + V_{\text{提取液一}})] \times F$$

$$= 5225 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times F$$

$C_{\text{标准}}$: α-酮戊二酸标准品浓度, 400nmol/mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.06mL; $V_{\text{上清}}$: 提取时上清的体积, 0.8mL; $V_{\text{提取液二}}$: 加入提取液二的体积, 0.15mL; $V_{\text{提取液一}}$: 加入提取液一的体积, 1mL; $V_{\text{液体}}$: 液体样本体积, 0.1mL; C_{pr} : 蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; N : 细胞或细菌数目, 以 10^6 计; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 采用 96 孔 UV 板测定时, 如果样本 $A1_{\text{测定}} < A1_{\text{空白}}$ 或 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.6$, 可以用蒸馏水对样本进行稀释或者缩短第二步 37°C 反应时间; 如果 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$, 可以加大样本量或者延长第二步 37°C 反应时间。最终计算时同步修改计算公式。
2. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取组织。
3. 温度对该实验影响较大, 各必保持反应温度在 37°C。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com