

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F047

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience® α -酮戊二酸 (α -KG) 荧光法测试盒

α -Ketoglutarate (α -KG) Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、尿液、动物组织和细胞样本中 α -酮戊二酸 (α -KG) 的含量。

检测原理

α -酮戊二酸 (α -Ketoglutarate, α -KG) 是三羧酸循环中重要的中间代谢产物, 是连接细胞内碳-氮代谢的关键节点。作为一种短链羧酸分子, α -酮戊二酸是谷氨酰胺、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。

α -酮戊二酸与丙氨酸在系列酶的作用下生成能与荧光探针结合的产物, 通过测定荧光值大小判断样本中 α -酮戊二酸含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	13 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	探针 (Probe)	1.2 mL×1 支	2.4 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)，恒温箱(37℃)，
低温离心机

试剂：生理盐水(0.9%NaCl)

耗材：50 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

取一瓶试剂二，用12 mL试剂一溶解，混匀备用，配制好的工作液分装后-20℃保存三天，避免反复冻融。

③ 试剂三工作液配制：

取一支试剂三，用1.2 mL双蒸水溶解，充分混匀，置于冰盒上避光待用，现配现用。

④ 50 mmol/L标准品配制：

取一支试剂五，用1 mL双蒸水溶解混匀，配制好的工作液即为50 mmol/L的标准品，-20℃避光保存三天。

⑤ 100 μmol/L标准品配制：

将50 mmol/L标准品与双蒸水按照1: 499的体积比进行稀释，稀释后的溶液即为100 μmol/L标准品，-20℃避光保存三天。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	10	20	30	50	60	80	100
100 μmol/L 标准品溶液(μL)	0	20	40	60	100	120	160	200
双蒸水(μL)	200	180	160	140	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织重量 (g) 与生理盐水 (0.9% NaCl) (mL) = 1: 9 进行匀浆，4℃ 12000 ×g 离心 15 min，取上清用 50 KD 超滤管 4℃ 12000 ×g 离心 15 min，收集滤液待测。

细胞样本：每 1×10^6 细胞中加入 200 μ L 生理盐水 (0.9% NaCl) 进行匀浆，4℃ 12000 ×g 离心 15 min，取上清用 50 KD 超滤管 4℃ 12000 ×g 离心 15 min，收集滤液待测。

血清、血浆及尿液样本：使用 50 KD 超滤管 4℃ 12000 ×g 离心 15 min，收集滤液待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.60-100 μ mol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10% 大鼠肾组织	不稀释	10% 大鼠脑组织	不稀释
10% 大鼠肺组织	不稀释	10% 小鼠肝组织	不稀释
大鼠血清	2-3	10^6 Jurkat 细胞	不稀释
10% 猪心组织	不稀释	人血清	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本，加入各测定孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和测定孔各加入 140 μL 试剂二工作液。
- ③ 向步骤②的各孔中加入 20 μL 试剂三工作液。
- ④ 向试剂③的各孔中加入 20 μL 试剂四。
- ⑤ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 荧光酶标仪于激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 下检测, 测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂二工作液(μL)	140	140
试剂三工作液(μL)	20	20
试剂四(μL)	20	20
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 荧光酶标仪于激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 下检测, 测定各孔荧光值。		

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中 α -酮戊二酸含量计算公式:

$$\alpha\text{-KG content} \text{ (}\mu\text{mol/kg wet weight)} = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{m}{V} \times f$$

细胞样本中 α -酮戊二酸含量计算公式:

$$\alpha\text{-KG content} \text{ (mmol/10}^6\text{)} = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{n}{V} \times f$$

血清(浆)样本中 α -酮戊二酸含量计算公式:

$$\alpha\text{-KG content} \text{ (}\mu\text{mol/L)} = \frac{\Delta F - b}{a} \times f$$

注解:

y: 标准孔荧光值-空白孔荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白孔荧光值)

m: 组织样本的质量, g

V: 匀浆液体积, mL

n: 细胞样本数量, 10^6

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

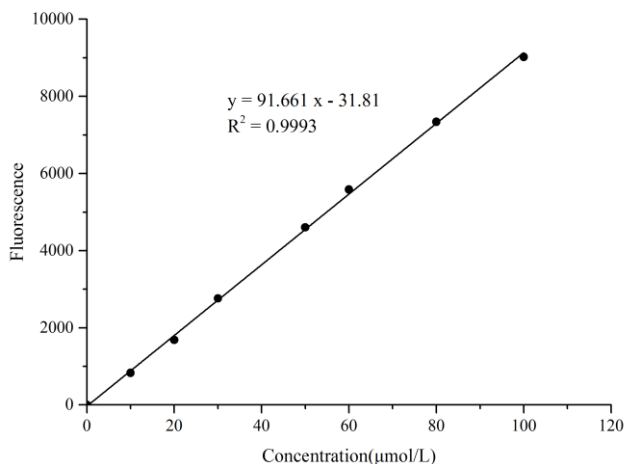
检测范围	0.60-100 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	4.0 %
灵敏度	0.60 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	2.0 %
平均回收率	99 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，测定荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	30	50	60	80	100
荧光值	547	1406	2078	3267	5050	6140	7629	9415
	568	1369	2406	3370	5271	6145	8164	9746
平均荧光值	557	1388	2242	3318	5161	6143	7897	9581
绝对荧光值	0	830	1685	2761	4603	5585	7339	9023

② 绘制标曲(如下图):



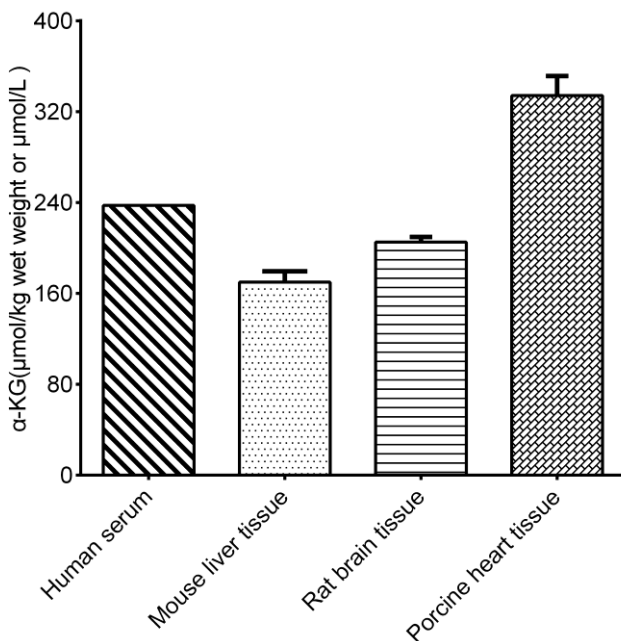
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取处理好的10%匀浆小鼠肝组织样本20 μL , 按说明书操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 91.661x - 31.81$, 空白孔平均荧光值为557.45, 测定孔平均荧光值为2256.69, 计算结果为:

$$\alpha\text{-KG} \text{ (}\mu\text{mol/kg wet weight)} = \frac{2256.69 - 557.45 + 31.81}{91.661} \div \frac{0.1}{0.9} = 169.97 \mu\text{mol/kg wet weight}$$

按说明书操作, 按照说明书, 测定人血清(加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、大鼠脑组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、猪心组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)的 $\alpha\text{-KG}$ 含量(如下图所示):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测定荧光值较小	样本中 α -KG 含量较低	增加样本匀浆浓度
	试剂二工作液配制时间过长	试剂二需现配现用,3天内使用完毕
标曲不成线性	试剂一失活	试剂一需-20℃保存,避免反复冻融

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

