

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

**产品货号：GBQ032**

**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® $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG) 荧光法测试盒**

### **$\alpha$ -Ketoglutarate ( $\alpha$ -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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://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<br>(Size 1)(48T) | 规格 2<br>(Size 2)(96T) | 保存方式<br>(Storage)  |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 试剂一<br>(Reagent 1) | 缓冲液<br>(Buffer Solution) | 13 mL×1 瓶             | 26 mL×1 瓶             | -20℃<br>保存 6 个月    |
| 试剂二<br>(Reagent 2) | 底物<br>(Substrate)        | 粉剂×1 瓶                | 粉剂×2 瓶                | -20℃<br>保存 6 个月    |
| 试剂三<br>(Reagent 3) | 酶试剂<br>(Enzyme Reagent)  | 粉剂×1 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂四<br>(Reagent 4) | 探针<br>(Probe)            | 1.2 mL×1 支            | 2.4 mL×1 瓶            | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂五<br>(Reagent 5) | 标准品<br>(Standard)        | 粉剂×2 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
|                    | 96 孔黑色酶标板                | 1 板                   |                       | 无要求                |
|                    | 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<sup>6</sup> 细胞中加入 200 μL 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 μmol/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 <sup>6</sup> 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  $\mu$ L 不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中。  
测定孔：取 20  $\mu$ L 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  $\mu$ L 试剂二工作液。
- ③ 向步骤②的各孔中加入 20  $\mu$ L 试剂三工作液。
- ④ 向试剂③的各孔中加入 20  $\mu$ L 试剂四。
- ⑤ 振板 5 s，37°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( $\mu$ L)                                                  | 20  | --  |
| 待测样本( $\mu$ L)                                                     | --  | 20  |
| 试剂二工作液( $\mu$ L)                                                   | 140 | 140 |
| 试剂三工作液( $\mu$ L)                                                   | 20  | 20  |
| 试剂四( $\mu$ L)                                                      | 20  | 20  |
| 振板 5 s，37°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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸含量计算公式:

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

血清(浆)样本中 $\alpha$ -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

$\Delta F$ : 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

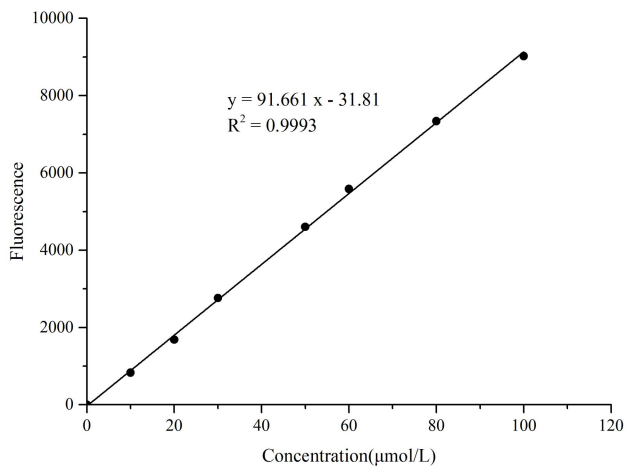
|       |                            |       |       |
|-------|----------------------------|-------|-------|
| 检测范围  | 0.60-100 $\mu\text{mol/L}$ | 平均批间差 | 4.0 % |
| 灵敏度   | 0.60 $\mu\text{mol/L}$     | 平均批内差 | 2.0 % |
| 平均回收率 | 99 %                       |       |       |

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20  $\mu\text{L}$ ，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<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 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)：



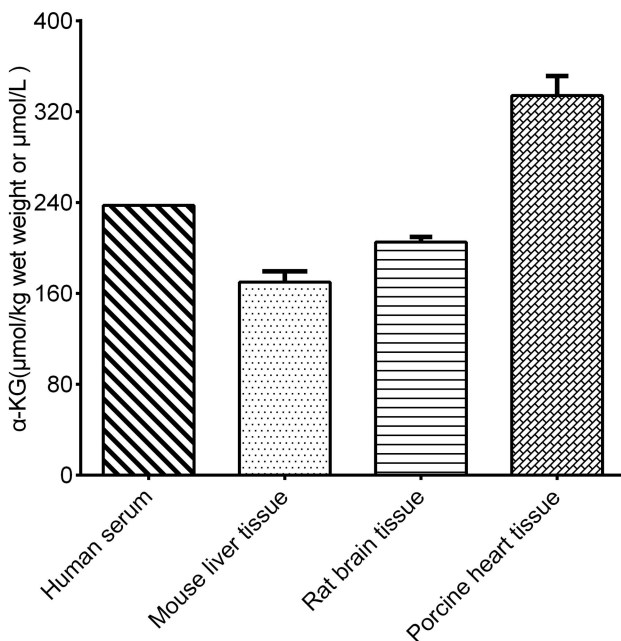
## 附录2 实例分析

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  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{L}$ )、小鼠肝组织(10%组织匀浆, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、大鼠脑组织(10%组织匀浆, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、猪心组织(10%组织匀浆, 加样量20  $\mu\text{L}$ )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 $\alpha$ -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。





