



α -酮戊二酸荧光检测试剂盒说明书

（ α -Ketoglutarate Fluorometric Assay Kit, 货号：Y022-1-1）

【试剂组成】

试剂编号	试剂组成	规格装量（100T）	保存条件
R1	分析 Buffer	20ml	-20°C保存
R2	荧光探针	200 μ l	-20°C避光保存
R3	酶液 A	200 μ l	-20°C保存
R4	酶液 B	200 μ l	-20°C保存
R5	辅因子	200 μ l	-20°C避光保存
R6	α -KG 标准品（10mM）	200 μ l	-20°C保存

注：试剂盒有效期 6 个月。

【产品简介】

α -酮戊二酸(α -Ketoglutarate, α -KG)是一种在细胞代谢中起着重要作用有机酸，也是合成多种氨基酸、蛋白质的重要前体物质，在食品、医药、化工和化妆品行业有广泛的应用。

α -酮戊二酸是三羧酸循环中一个关键的中间代谢物，经常作为评价代谢障碍的重要指标。例如，在细胞发生铜死亡时，因铜离子累积使硫辛酰化蛋白异常寡聚化，导致其参与的三羧酸循环发生障碍，因此检测 α -酮戊二酸和丙酮酸的含量变化也是判断细胞发生铜死亡的指标之一。

本试剂盒是一种基于荧光法或比色法的快速、灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、组织、细胞以及培养上清中 α -酮戊二酸含量进行检测的试剂盒，检测原理(参考图 1): α -酮戊二酸在丙氨酸转氨酶的催化下与丙氨酸反应生成丙酮酸和谷氨酸，丙酮酸在丙酮酸氧化酶作用下氧化产生 H_2O_2 ，在 HRP 作用下荧光探针与 H_2O_2 生成强烈的红色荧光产物并具有可见光吸收，荧光强度或吸光度与 α -酮戊二酸的含量成正比，因此可采用荧光法或比色法检测，荧光法的灵敏度可检出低至 2 μ M 的 α -酮戊二酸，在 2-200 μ M 浓度范围内有良好的线性关系，是比色法的十倍，通常 0.5-2 μ l 血清或血浆样品就足够用于荧光法的检测。本试剂盒同时提供 α -酮戊二酸标准溶液，可以通过建立标准曲线，计算出样品中的 α -酮戊二酸含量。



图 1. α -酮戊二酸检测原理图



三、测定方法

1、配制反应工作液：

根据待检测样品(包括标准品)的数量，参考下表配制适量的反应工作液：

样本数量	1	10	20	50
分析 Buffer (μl)	72	720	1440	3600
荧光探针 (μl)	2	20	40	100
酶液 A (μl)	2	20	40	100
酶液 B (μl)	2	20	40	100
辅因子 (μl)	2	20	40	100
工作液总体积(μl)	80	800	1600	4000

配制好的反应工作液置 4°C 或冰浴避光保存，现配现用，当天使用完毕。

注 1：酶液量较少且易沉降，使用前先离心集液并混匀后再取用。

注 2：建议设背景对照孔：将不含酶液 A（分析 Buffer 替代）的反应工作液作为背景对照。

2、建立标准曲线

(a) 比色法：取 10μl α-KG 标准品(10mM)，加入 90μl 分析 Buffer 混匀，配制成 1000μM 的 α-KG 标准溶液后，再分别取 0、0.4、1、2、4、10、20μl 加入 96 孔板的标准品孔中，相应地用分析 Buffer 补足至 20μl，配制成浓度分别为 0、20、50、100、200、500、1000μM 的标准溶液。

(b) 荧光法：取 2μl α-KG 标准品 (10mM)，加入 98μl 分析 Buffer 混匀，配制成 200μM 的 α-KG 标准溶液后，再分别取 0、0.5、1、2、5、10、20μl 加入 96 孔板的标准品孔中，并相应地用分析 Buffer 补足至 20μl，配制成浓度分别为 0、5、10、20、50、100、200μM。

3、取 1-20μl 样品或稀释样品至 96 孔板样品孔中，并相应地用分析 Buffer 补足至 20μl。同时设仅含分析 Buffer 的孔为空白对照。

注：建议预实验优化样本的稀释倍数 以确保样品检测数值在标准曲线范围内。

4、各孔加入 80μl 的反应工作液，混匀，37°C 避光反应 30 分钟。

注：如果吸光度偏低或荧光偏弱，可适当延长反应时间，例如反应 45 或 60 分钟。

5、酶标仪检测， 比色法： 检测 A570 处的吸光度；

荧光法，激发波长为 560nm，发射波长为 590nm 检测荧光值。

6、计算

建立标准曲线，并计算样品中 α-酮戊二酸的浓度(A)，

α-酮戊二酸浓度的计算公式如下：

$$C (\mu\text{M}) = A \times n$$

注 1：A 为根据标准曲线确定的 α-酮戊二酸浓度(μM)；

n 为样品总稀释倍数。