

α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S001 微板法 96 样)

一、产品简介:

α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH, EC 1.2.4.2) 是三羧酸循环调控关键酶之一, 广泛存在于动物、植物微生物和培养细胞中。可催化α-酮戊二酸、NAD⁺ 和辅酶 A 生成琥珀酰辅酶 A、二氧化碳和 NADH, 通过检测 NADH 在 340 nm 的上升速率即可得出α-KGDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|-------|---------------------------------|
| 提取液 | 液体 120mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 20mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 1 支 | 4°C保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 的蒸馏水溶解。 |
| 试剂三 | 粉剂 1 支 | 4°C保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 的蒸馏水溶解。 |

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按细菌/细胞数量 (10⁴ 个): 提取液 (mL) 为 1000~5000: 1 比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|---|-----|
| 样本 | 40 |
| 试剂一 | 140 |
| 试剂二 | 10 |
| 试剂三 | 10 |
| 混匀, 37°C条件下, 30s 时于 340nm 处读取 A1 值, 15min 后读取 A2 值, ΔA=A2-A1。 | |

【注】若 ΔA 在零附近徘徊, 可以增加样本量 V1 (如增至 80μL, 则试剂一相应减少),

或延长反应时间 T (如增至 30min 或更长), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (1000 \times V1 \div V) \div T = 0.11 \times \Delta A$$

4、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 107.2 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d---比色皿光径, 0.5cm;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

V1---加入样本体积, 0.04 mL;

V---加入提取液体积, 1mL;

T---反应时间, 15min;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

W---样本质量, g;

1000---细菌或细胞总数, 1000 万。