

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 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 的蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 1 支	-20℃ 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 的蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃ 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液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 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℃ 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(10^4 个): 提取液(mL)为 1000~5000: 1 比例进行提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上(等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (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， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】若 ΔA 在零附近徘徊，可以增加样本量 $V1$ （如增至 80 μ L，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。

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

2、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。

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

3、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。

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

4、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。

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

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

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，万。