

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0840F 紫外分光法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	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 mg×1 支	4℃保存	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:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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 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 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、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 或于水浴锅 (25℃) 中孵育 15-30min。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管
样本	100
试剂一	600
试剂二	20
试剂三	20
混匀, 37℃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 小于 0.01，可以增加样本量 V_1 （如增至 140 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 V_1 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol/min/mg prot})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 79.3 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 79.3 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (1000 \times V_1 \div V) \div T = 0.08 \times \Delta A$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol/min/mL})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 79.3 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；

d ---比色皿光径，1cm；

V_2 ---反应体系总体积， 7.4×10^{-4} L；

V_1 ---加入样本体积，0.1 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。