

## α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0840W48 微板法 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<sup>+</sup> 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°C 保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 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 (10<sup>4</sup> 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) 或于水浴锅 (25°C) 中孵育 15-30min。

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。

## 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (1000 \times V_1 \div V) \div T = 0.11 \times \Delta A$$

### 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 107.2 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---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；

$V_2$ ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

$V_1$ ---加入样本体积，0.04 mL；

$V$ ---加入提取液体积，1mL；

$T$ ---反应时间，15min；

$\text{Cpr}$ ---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。