

**$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$ -KGDH) 活性检测试剂盒 (微量法)**  
(本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0184	$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$ -KGDH) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 110mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 1mL × 1 支	-20℃
试剂三	液体 22mL × 1 瓶	4℃
试剂四	粉剂 × 1 支	4℃
试剂五	粉剂 × 1 支	4℃
试剂六	粉剂 × 1 支	-20℃
试剂七	粉剂 × 1 支	-20℃
试剂八	粉剂 × 1 支: 临用前加入 0.8mL 双蒸水充分溶解, 用不完的试剂-20℃保存。	-20℃, 避光

工作液的配制: 把试剂四、试剂五、试剂六、试剂七转移到试剂三中, 充分溶解混匀。

### 一、产品说明

$\alpha$ -KGDH (EC 1.2.4.2) 广泛存在于动物、植物微生物和培养细胞的线粒体中, 是三羧酸循环调控关键酶之一, 催化 $\alpha$ -酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰辅酶 A。

$\alpha$ -KGDH 催化 $\alpha$ -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, NADH 在 340 nm 有特征吸收峰, 以 NADH 的生成速率表示 $\alpha$ -KGDH 活性。

### 二、自备材料

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

### 三、样品准备

称取约 0.1g 组织或收集约 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂二, 冰浴用匀浆器或研钵充分研磨, 4℃ 11000 g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

### 四、操作步骤

**正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**

- 1、酶标仪或分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、空白管: 取 200 $\mu$ L 工作液加入微量石英比色皿或 96 孔板中, 37℃ 孵育 5min 后取出比色皿, 再依次加入 8 $\mu$ L 试剂八和 12 $\mu$ L 蒸馏水, 混匀并立即测量 340nm 处 0s 的吸光值 A1, 37℃ 准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A$  空白=A2-A1。
- 3、测定管: 取 200 $\mu$ L 工作液加入微量石英比色皿或 96 孔板中, 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min 后取出比色皿, 再依次加入 8 $\mu$ L 试剂八和 12 $\mu$ L 样本, 混

匀并立即测量 340nm 处 0s 的吸光值 A3, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 中准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min 时的吸光值 A4, 计算  $\Delta A$  测定=A4-A3。

## 五、 $\alpha$ -KGDH 活性的计算

### A. 用 96 孔板测定的计算方法如下:

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 2456.2 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr.$$

2、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADH 为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 2480.7 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W.$$

3、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌/细胞在反应体系中每 min 生成 1nmol 的 NADH 为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T \\ = 4.962 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}).$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2.2 \times 10^{-4}$ L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm;

d: 96 孔板光径, 0.6cm; V 样: 加入样本体积, 0.012 mL; V 样总: 加入试剂一和试剂二体积, 1.01 mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

### B. 用微量石英比色皿的计算方法如下:

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 1473.7 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr.$$

2、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 1488.5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W.$$

3、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌/细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T \\ = 2.977 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}).$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2.2 \times 10^{-4}$ L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.012 mL; V 样总: 加入试剂一和试剂二体积, 1.01mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

## 六、注意事项

- 1、测定过程中所有试剂和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 3、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
- 4、测定管的  $\Delta A$  值在 0.01-0.25 之间, 若测定管的  $\Delta A$  值大于 0.25, 需将样本进行稀释。