



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

α 酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)活性检测试剂盒(分光光度法)

货号: R41932

规格: 50T/48S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	60mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	0.6mL×1瓶	易挥发试剂, 用完后尽快密封; -20℃保存;
试剂-C	60 mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-D	1.2 mL×1支	2-8℃保存;
试剂-E	粉剂×2支	2-8℃保存; 临用前取1支试剂-E,加入1mL试剂-C,充分溶解, 2-8℃可保存4周;
试剂-F	粉剂×2支	-20℃保存; 提供一个5mL试剂瓶, 临用前取1支试剂-F,加入3mL试剂-C,充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存4周, 避免反复冻融;
试剂-G	粉剂×2支	-20℃保存; 临用前取1支试剂-G加入1.5mL试剂-C充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存4周, 避免反复冻融;
试剂-H	粉剂×2支	-20℃保存; 临用前取1支试剂-H,加入1mL蒸馏水, 充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存4周, 避免反复冻融;
工作液配制	临用前依次取22 mL 试剂-C、0.5 mL 试剂-D、1 mL 试剂-E、2.75 mL 试剂-F、1.25 mL 试剂-G(共27.5mL,约27T),充分混合待用, 现用现配。	

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: α -酮戊二酸脱氢酶 (Alpha ketoglutarate dehydrogenase; α -KGDH; AKGDH; 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



三羧酸循环的关键酶，催化 α -酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰辅酶 A。 α -KGDH 对于三羧酸循环的进行，能量代谢的稳定，神经递质的代谢等诸多生理及病理过程极为重要。

原理： α -KGDH 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，NADH 在 340 nm 有特征吸收峰，以 NADH 的生成速率表示 α -KGDH 活性。

自备用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1mL 试剂-A 和 10 μ L 试剂-B，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 然后 11000g，4℃离心 10min，取上清。
3. 上清液即胞浆提取物，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm 处，蒸馏水调零。
2. 空白管：取 1mL 工作液加入 1mL 石英比色皿，37℃孵育 5min 后，再依次加入 40 μ L 试剂-H 和 60 μ L 蒸馏水，立即开始计时 10s，混匀并立即测量 340nm 处 10s 的吸光值 A1，37℃准确反应 2min，记录 340nm 处 2min10s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 空白=A2-A1。空白管只需测 1-2 次。
3. 测定管：取 1mL 工作液加入 1mL 石英比色皿，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min 后，再依次加入 40 μ L 试剂-H 和 60 μ L 样本，立即开始计时 10s，混匀并立即测量 340nm 处 10s 的吸光值 A3，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）中准确反应 2min，记录 340nm 处 2min10s 时的吸光值 A4，计算 ΔA 测定=A4-A3

α -KGDH 活力单位的计算：



1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2. 按样本质量计算

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

3. 按细菌或细胞数量计算

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

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

V 反总: 反应体系总体积, 1.1×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.06mL; V 样总: 加入试剂-A 和 试剂-B 体积, 1.01mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。