



α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)试剂盒

微板法

货号: R45031-48S/96S

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。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	R45031-48S	R45031-96S	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	液体120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体10mL×1瓶	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂mg×1支	粉剂mg×1支	4℃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	粉剂mg×1支	4℃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

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。

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℃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℃)或于水浴锅(25℃)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℃条件下, 30s时于340nm处读取A1值, 15min后读取A2值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

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1nmol的 NADH定义为一个酶活力单位。

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

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。

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



$$=107.2 \times \Delta A \div W$$

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。

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

$$=0.11 \times \Delta A$$

4、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟生成1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$=107.2 \times \Delta A$$

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;

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, 15 min;

C_{pr} --- 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。