

α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)活性检测试剂盒

(货号: SH3015 酶标法 96T)

一、产品简介

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -Ketoglutarate Dehydrogenase, α -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 α -酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰辅酶 A。

二、检测原理

α -酮戊二酸脱氢酶催化 α -酮戊二酸、NAD⁺和辅酶 A (CoA) 生成琥珀酰 CoA、CO₂和 NADH。生成的 NADH 在电子耦合试剂 1-mPMS 的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 Formazan, 该产物在 450 nm 波长处有特征吸收峰。反应体系中生成的 Formazan 与样品中 α -酮戊二酸脱氢酶的活性成正比。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×2 支	4℃保存	临用前甩几下或 4℃离心使试剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水溶解, 分装后-20℃保存。
试剂三	粉剂×2 支	4℃保存	临用前甩几下或 4℃离心使试剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水溶解, 分装后-20℃保存。
试剂四	液体 1mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	

四、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器和蒸馏水。

五、 α -酮戊二酸脱氢酶活性测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定, 了解本批样本情况, 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 (水分充足样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 在 4℃ 12000g 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; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 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); 12000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

③液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

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

③试剂一、二、三、四可按照 150:10:10:10 比例配成混合液 (一枪加 180μL 该混合液, 该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准品管
样本	20	
标准品		20
试剂一	150	150
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
混匀, 立即于 450nm 处读取各管吸光值 A1, 37℃孵育 15min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。		

【注】: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 可联系我司提供优化建议。

六、结果计算

- 1、根据标准曲线，计算 ΔA 对应的 NADH 浓度 C(单位为 $\mu\text{mol/mL}$)。例如本说明书中的标准曲线为 $y=0.8284x-0.0145$ ，则 $C=(\Delta A+0.0145)/0.8284$ 。

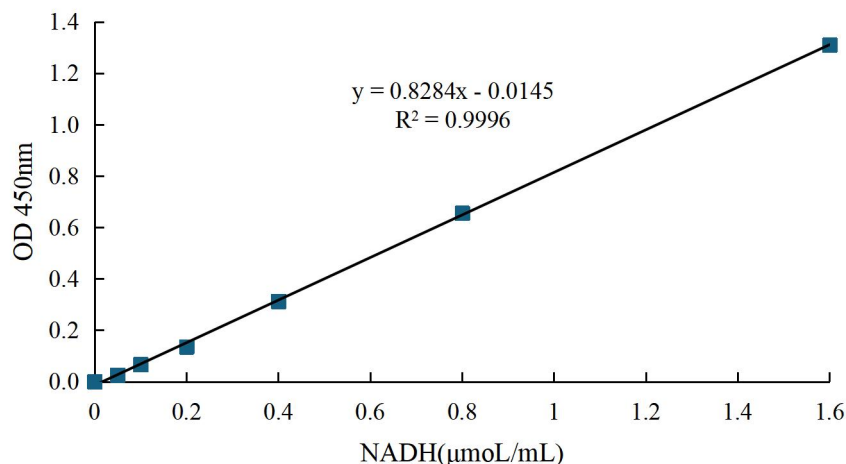


图 1 α -KGDH 活性检测试剂盒的标准曲线效果图，图中数据仅供参考。

- 2、按样本鲜重计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每克组织每分钟产生 1 μmol NADH 为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\mu\text{mol/min/g 鲜重})=C \times V1 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

- 3、按照细菌或细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 μmol NADH 为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\mu\text{mol/min}/10^4\text{cell})=C \times V1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

- 4、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每毫克组织蛋白每分钟产生 1 μmol NADH 为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\mu\text{mol/min/mg prot})=C \div Cpr \div T \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

T---反应时间，15min；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒（货号：AR0146）。

七、标准曲线制作过程



- 1、制备标准品母液 ($2\mu\text{mol/mL}$): 标准品溶于 1mL 蒸馏水中 (母液可分装并 -20°C 保存)。
- 2、将 $2\mu\text{mol/mL}$ 的 NADH 标准溶液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol/mL}$ 。也可以根据实际情况调整浓度。
- 3、按标准品管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。