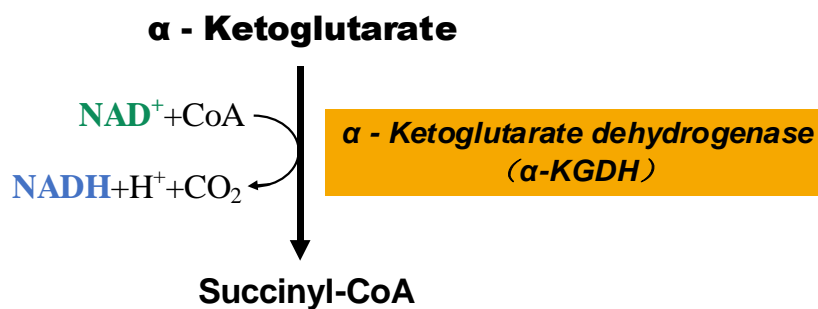




α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
 α -Ketoglutarate Dehydrogenase (α -KGDH) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 活性检测试剂盒

α-Ketoglutarate Dehydrogenase (α-KGDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 作为 α-酮酸代谢的关键酶, 可催化 α-酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰 CoA 和 NADH, 是三羧酸循环的关键调控位点, 在碳代谢、氨基酸代谢和能量代谢过程中发挥着重要作用。

α-酮戊二酸脱氢酶能够催化 α-酮戊二酸、NAD⁺和 CoA 生成琥珀酰 CoA、CO₂和 NADH, NADH 在 340 nm 具有特征吸收峰, 通过测定 NADH 生成速率即可表征 α-KGDH 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 600 μL×2 支	-20°C 保存	易挥发试剂, 使用后尽快密封保存
试剂三	液体 28 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 500 μL×1 支	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 支	4°C 保存	使用前每支加入 1 mL 试剂三充分溶解 (配制后 4°C 可保存一个月)
试剂六	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1.5 mL 试剂三充分溶解 (分装后 -20°C 可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂七	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1 mL 试剂三充分溶解 (分装后 -20°C 可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂八	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 0.4 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存一个月, 避免反复冻融)
检测工作液的配制 (现用现配): 使用前依次吸取 8.05 mL 试剂三、0.2 mL 试剂四、1 mL 试剂五、1.25 mL 试剂六、0.5 mL 试剂七, 充分混匀即为检测工作液 (或按比例配制)。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板 (UV)、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量）

称取 100 mg 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1 mL 试剂一和 10 μL 试剂二，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，4°C 12000 g 离心 10 min，取上清即为粗酶液，置于冰上待测。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将检测工作液 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）预热 5 min。
- ③在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
检测工作液	200	200
试剂八	8	8
粗酶液	12	-
蒸馏水	-	12

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）准确反应 120 s，测定 130 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定， ΔA 空白=A2 空白-A1 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.α-酮戊二酸脱氢酶（α-KGDH）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2947.4 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

- ②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2977 \times \Delta A}{W}$$

- ③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2977 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1473.7 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1488.5 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1488.5 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.012 mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01 mL；V 反总：反应体系总体积， 2.2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，120 s=2 min。

四、注意事项

- ①测定过程中所有试剂和粗酶液均需在冰上放置，以免变性和失活；
- ②准确在 10 s 和 130 s 处完成吸光值测定，以保证实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ③ ΔA 测定应在 0.01-0.25 之间，若 ΔA 测定大于 0.25，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ④提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样品蛋白浓度时需减去提取液的蛋白含量；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

