

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、保存条件: 4℃保存, 6个月有效。

五、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。

六、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(10⁴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 180 μL 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。

七、结果计算

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

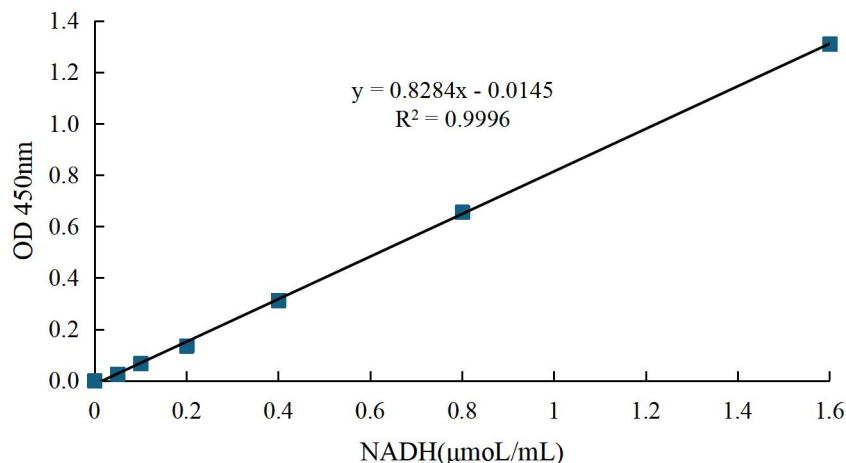


图 1 α-KGDH 活性检测试剂盒的标准曲线效果图，图中数据仅供参考。

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。

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

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。

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



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。

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

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）。

八、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℃ 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。