

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0755	α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 60mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 0.6mL × 1 支	-20℃
试剂三	液体 55mL × 1 瓶	4℃
试剂四	粉剂 × 1 支	4℃
试剂五	粉剂 × 1 支	4℃
试剂六	粉剂 × 1 支	-20℃
试剂七	粉剂 × 1 支	-20℃
试剂八	粉剂 × 1 支: 临用前加入 2mL 双蒸水充分混匀待用, 用不完的试剂仍-20℃保存。	-20℃, 避光

工作液的配制: 把试剂四、试剂五、试剂六、试剂七转移到试剂三中, 充分溶解混匀。

一、产品说明

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。

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。

二、自备材料

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。

三、样品准备

称取约 0.1g 组织或收集约 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂二, 冰浴用匀浆器或研钵充分研磨, 4℃ 11000 g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 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 后取出比色皿, 再依次加入 40 μ L 试剂八和60 μ L 蒸馏水, 混匀并立即测量 340nm 处0s 的吸光值 A1, 37℃准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min 时的吸光值 A2, 计算 ΔA 空白=A2-A1。
- 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。取出比色皿, 再依次加入 40 μ L 试剂八和 60 μ L 样本, 混匀并立即测量 340nm 处 0s 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 2min 时的吸光值 A4, 计算 ΔA 测定=A4-A3。

五、 α -KGDH 活性的计算

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 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、按照样本鲜重计算:

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

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

3、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌/细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 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: 加入试剂一和试剂二体积, 1.01mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

六、注意事项

- 1、测定过程中所有试剂和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 3、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
- 4、测定管的 ΔA 值在 0.01-0.25 之间, 若测定管的 ΔA 值大于 0.25, 需将样本进行稀释。