

## α-酮戊二酸脱氢酶（α-KGDH）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10390W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

### 一、指标介绍：

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<sup>+</sup> 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。

### 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度     | 注意事项                                                                                   |
|------|--------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                                        |
| 试剂一  | 液体 20mL×1 瓶  | 4℃保存     |                                                                                        |
| 试剂二  | 粉剂 1 支       | 4℃保存     | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 1.1mL 的蒸馏水溶解；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三  | 粉剂 1 支       | -20℃避光保存 | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 1.1mL 的蒸馏水溶解；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### 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 液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

##### ③ 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<sup>4</sup> 个）：提取液（mL）为 1000~5000：1 比例进行提取。

#### 2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

|          |     |
|----------|-----|
| 试剂组分（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， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

【注】若 $\Delta A$  在零附近徘徊，可以增加样本量  $V1$ （如增至 80 $\mu$ L，则试剂一相应减少），  
或延长反应时间  $T$ （如增至 30min 或更长），则改变后的  $V1$  和  $T$  需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、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。

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

### 2、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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

### 3、按照液体体积计算：

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

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

### 4、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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (1000 \times V1 \div V) \div T = 0.11 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； $d$ ---比色皿光径，0.5cm；  
 $V2$ ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； $V1$ ---加入样本体积，0.04 mL；  
 $V$ ---加入提取液体积，1mL； $T$ ---反应时间，15min；  
 $Cpr$ ---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。