

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1018

产品规格: 100管/96样

产品简介

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340nm有特征吸收峰, 以NADH的生成速率表示 α -KGDH活性。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体110mL×1瓶	4℃
试剂二	液体1mL×1瓶	-20℃
试剂三	液体22mL×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瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂八: 临用前加入0.8 mL双蒸水充分混匀待用, 用不完的试剂仍-20℃避光保存。
2. 工作液的配制: 临用前把试剂四、试剂五、试剂六、试剂七转移到试剂三中混合溶解待用。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板 (UV板)、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤 (仅供参考):

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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℃11000g离心10min, 取上清, 置冰上待测。

二、操作步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。
2. 空白管:

取200 μ L工作液加入微量石英比色皿或96孔板中, 37℃孵育5min后取出比色皿, 再依次加入8 μ L试剂八和12 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 $\Delta A_{\text{空白}}=A_2-A_1$ 。

3. 测定管:

取200 μ L工作液加入微量石英比色皿或96孔板中, 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8 μ L试剂八和12 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 $\Delta A_{\text{测定}}=A_4-A_3$ 。

三、 α -KGDH活性计算

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 1473.7 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

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

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/g质量)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/10^4 cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T$$

$$= 2.977 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应体系总体积， 2.2×10^{-4} 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，0.012mL；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：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

b. 用96孔板测定的计算公式如下：

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 2456.2 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/g质量)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 2480.7 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/10^4 cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T$$

$$= 4.962 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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：96孔板光径，0.6cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

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℃或25℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃或25℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃或25℃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。
5. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com