α-酮戊二酸脱氢酶（α-KGDH）活性测定试剂盒说明书

产品包装

货号	名称	规格
TS-55684	α-酮戊二酸脱氢酶（α-KGDH）检测试剂盒	100T/96S

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^+ 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。

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 2mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1. 1mL 的蒸馏水溶解； 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 2mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1. 1mL 的蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）。

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（10^4 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，ΔA=A2-A1。	

【注】若ΔA 在零附近徘徊，可以增加样本量 V1（如增至 80μL，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。

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。

α-KGDH 活性(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=107.2×ΔA÷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。

α-KGDH 活性(nmol/min/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=107.2×ΔA÷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。

α-KGDH 活性(nmol/min/mL)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷V1÷T=107.2×ΔA

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。

α-KGDH 活性(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(1000×V1÷V)÷T=0.11×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm； d---比色皿光径，0.5cm；

V2---反应体系总体积，2×10^{-4} 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。