

α 酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1107

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞和真菌

产品简介

α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH; EC 1.2.4.2) 广泛存在于动物、植物、微生物和体外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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 α-KGDH 活性检测方法，其原理是 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 处有特征吸收峰，根据 NADH 的生成速率可计算获得 α-KGDH 的活性。

产品内容

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|-------|--------|--------|-----------|
| | 48T | 96T | |
| 试剂一 | 50mL | 100mL | 4℃ 保存 |
| 试剂二 | 10mL | 20mL | 4℃ 保存 |
| 试剂三 | 1mL | 2mL | -20℃ 避光保存 |
| 试剂四 | 10mL | 20mL | 4℃ 保存 |
| 试剂五 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | -20℃ 避光保存 |
| 试剂六 | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | -20℃ 避光保存 |

自备耗材

酶标仪或分光光度计 (能测 340nm 处的吸光度)
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意：各组分 (小管试剂) 开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃ 避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂五：临用前配制，对于 48T，加入 9mL 试剂四；96T 加入 18mL 试剂四。充分混匀待用；未用完的试剂分装-20℃ 避光保存，避免反复冻融。

试剂六：临用前配制，对于 48T，加入 0.5mL 去离子水；96T 加入 1mL 去离子水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，避免反复冻融。

样本制备

组织、细胞和真菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴匀浆；

产品说明书

- 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
- 再次离心上清，11,000 g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第5步操作；
- (选做)上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的 α -KGDH（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）；
- 在沉淀中加入200 μ L试剂二和2 μ L试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步 α -KGDH活性检测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

实验步骤

- 酶标仪或分光光度计预热30min以上，调节波长到340nm。分光光度计去离子水调零。
- 试剂五于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育10min。
- 在96孔UV板或微量石英比色皿中依次加入10 μ L样本、10 μ L试剂六和180 μ L试剂五，迅速混匀后于340nm检测，记录20s和2min20s的吸光值，分别记为 A_1 和 A_2 ，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意：1. 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 ΔA 小于0.001可适当加大样本量；如果 ΔA 大于0.3，可用试剂二稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

- 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）。
- 因通过反应速率计算酶活，使用96孔UV板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定4-8个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 使用96孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算：

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。

α -KGDH 上清活性(U/g 鲜重)=[$\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W$) \div T=3,247.59 \times $\Delta A_{\text{上清}} \div W$

α -KGDH 沉淀活性(U/g 鲜重)=[$\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W$) \div T=649.52 \times $\Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

总 α -KGDH 活性(U/g 鲜重)= α -KGDH 上清活性+ α -KGDH 沉淀活性=3,247.59 \times $\Delta A_{\text{上清}} \div W$ +649.52 \times $\Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

2. 按细胞数量计算：

单位的定义：每1万个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。

α -KGDH 上清活性(U/ 10^4 cells)=[$\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500$) \div T=6.5 \times $\Delta A_{\text{上清}}$

α -KGDH 沉淀活性(U/ 10^4 cells)=[$\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div ($V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500$) \div T=1.3 \times $\Delta A_{\text{沉淀}}$

总 α -KGDH 活性(U/ 10^4 cells)= α -KGDH 上清活性+ α -KGDH 沉淀活性=6.5 \times $\Delta A_{\text{上清}}$ +1.3 \times $\Delta A_{\text{沉淀}}$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； d ：0.5 cm； 10^9 ：1 mol= 1×10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min； $\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01 mL；W：样品质量，g； $\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂二和试剂三的总体积，0.202 mL；500：细胞总数，500万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm调整为 d :1cm进行计算即可。

注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
- 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
- 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
- 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1005 柠檬酸合酶(CS)检测试剂盒(微量法)
- PMK1109 琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒(微量法)
- PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶(MDHm)检测试剂盒(微量法)
- PMK1115 乳酸(LA)检测试剂盒(微量法)
- PMK1116 丙酮酸(PA)检测试剂盒(微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

