

α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0715

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 28 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂五	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂六	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂七	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂八	粉剂×2 支	-20℃保存

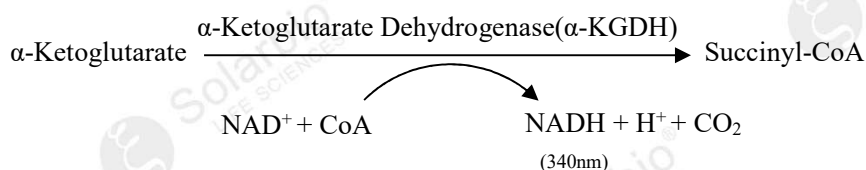
溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
2. 试剂五：临用前取 1 支试剂五，加入 1 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃保存 4 周；
3. 试剂六：临用前取 1 支试剂六，加入 1.5 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
4. 试剂七：临用前取 1 支试剂七，加入 1 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融（1 支粉剂溶解后可做 100T，为了延长使用时间，此产品多给 1 支粉剂）；
5. 试剂八：临用前取 1 支试剂八，加入 0.4mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
6. 工作液的配制：临用前依次取 8.05 mL 试剂三、0.2 mL 试剂四、1 mL 试剂五、1.25 mL 试剂六、0.5 mL 试剂七（共 11mL，约 55T），充分混合待用，现用现配。

产品说明：

α-KGDH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。

需自备的仪器和用品：

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

操作步骤：

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 10μL 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、紫外分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计需用蒸馏水调零。

2、空白管：

取200μL工作液加入微量石英比色皿或96孔UV板中，37℃孵育5min后，再依次加入8μL试剂八和12μL蒸馏水，立即开始计时10s，混匀并立即测量340nm处10s的吸光值A1，37℃准确反应2min，记录340nm处2min10s时的吸光值A2，计算ΔA空白=A2-A1。空白管只需测1-2次。

3、测定管：

取200μL工作液加入微量石英比色皿或96孔UV板中，在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育5min后，再依次加入8μL试剂八和12μL样本，立即开始计时10s，混匀并立即测量340nm处10s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2min10s时的吸光值A4，计算ΔA测定=A4-A3。

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：

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，2.2×10⁻⁴L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

b.用96孔UV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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T$$
$$= 4.962 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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UV板光径，0.6cm；
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， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

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、微量石英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。在反应过程中把微量石英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。

实验实例：

- 1、取 0.1g 稗草进行样本处理，将取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作，使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定= $A_4-A_3=0.3243-0.3115=0.0128$ ， ΔA 空白= $A_2-A_1=0$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\alpha\text{-KGDH 活性 (U/g 质量)} = 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times 2$ （稀释倍数）= 381.056 U/g 质量。
- 2、取 0.1g 小鼠肝脏进行样本处理，4℃ 11000g 离心 10min，取上清后按照测定步骤操作，使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定= $A_4-A_3=1.2123-0.9623=0.2500$ ， ΔA 空白= $A_2-A_1=0$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\alpha\text{-KGDH 活性 (U/g 质量)} = 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 3721.25$ U/g 质量。

相关发表文献：

- [1] Ye B, Yang L, Liu B, Liu N, Fan D, Li H, Sun L, Du Y, Wang S, Tian Y, Fan Z. Induction of functional neutrophils from mouse fibroblasts by thymidine through enhancement of Tet3 activity. Cell Mol Immunol. 2022 May;19(5):619-633. doi: 10.1038/s41423-022-00842-9. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35301470; PMCID: PMC9061759.
- [2] Liu Y, Fang D, Yang K, Xu T, Su C, Li R, Xiao X, Wang Z. Sodium dehydroacetate confers broad antibiotic tolerance by remodeling bacterial metabolism. J Hazard Mater. 2022 Jun 15;432:128645. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128645. Epub 2022 Mar 9. PMID: 35299107.





- [3] Li F, Liu H, Wu X, Song Z, Tang H, Gong M, Liu L, Li F. Tetrathiomolybdate Decreases the Expression of Alkaline Phosphatase in Dermal Papilla Cells by Increasing Mitochondrial ROS Production. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 4;24(4):3123. doi: 10.3390/ijms24043123. PMID: 36834536; PMCID: PMC9960908.
- [4] Zhang XT, Hu J, Su LH, Geng CA, Chen JJ. Artematrolide A inhibited cervical cancer cell proliferation via ROS/ERK/mTOR pathway and metabolic shift. *Phytomedicine.* 2021 Oct;91:153707. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153707. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34450376.
- [5] Wu J, Wang L, Zhang Y, Zhang S, Ahmad S, Luo Y. Synthesis and Photoactivated Toxicity of 2-Thiophenylfuranocoumarin Induce Midgut Damage and Apoptosis in *Aedes aegypti* Larvae. *J Agric Food Chem.* 2021 Jan 27;69(3):1091-1106. doi: 10.1021/acs.jafc.0c07237. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33432806.

参考文献:

- [1] Park L C H, Calingasan N Y, Sheu K F R, et al. Quantitative α -ketoglutarate dehydrogenase activity staining in brain sections and in cultured cells[J]. *Analytical biochemistry*, 2000, 277(1): 86-93.

相关系列产品:

- BC2150/BC2155 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒
- BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
- BC2160/BC2165 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒

