

α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

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：BC0710

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 1.2 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

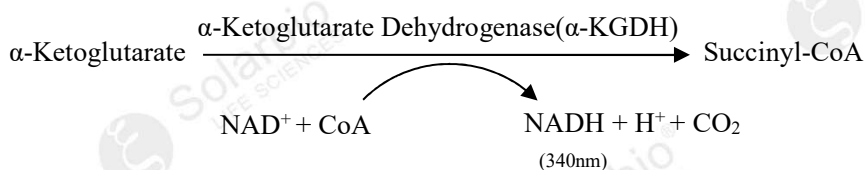
溶液的配制：

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，可 2-8℃保存 4 周；
3. 试剂六：提供一个 5 mL 试剂瓶，临用前取 1 支试剂六，加入 3 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 1.5 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；
5. 试剂八：临用前取 1 支试剂八，加入 1 mL 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 22 mL 试剂三、0.5 mL 试剂四、1 mL 试剂五、2.75 mL 试剂六、1.25 mL 试剂七（共 27.5mL，约 27T），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340 nm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、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、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、测定步骤

1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长到340nm，蒸馏水调零。

2、空白管：

取1mL工作液加入1mL石英比色皿，37℃孵育5min后，再依次加入40μL试剂八和60μL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1mL工作液加入1mL石英比色皿，在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育5min后，再依次加入40μL试剂八和60μL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

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，1.1×10⁻³ L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；d：1mL石英比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.06mL；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。

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、1mL 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 1mL 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，测得计算 ΔA 测定= $A_4-A_3=0.323-0.312=0.011$ ， ΔA 空白= $A_2-A_1=0$ ，按样本质量计算酶活得：
 α -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) = 327.47 U/g 质量。
- 2、取 0.1g 小鼠肝脏进行样本处理，4°C 11000g 离心 10min，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定= $A_4-A_3=1.2-0.957=0.243$ ， ΔA 空白= $A_2-A_1=0$ ，按样本质量计算酶活得：
 α -KGDH 活性 (U/g 质量) = $1488.5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 3617.055$ U/g 质量。

相关发表文献：

- [1] Lai T, Sun Y, Liu Y, Li R, Chen Y, Zhou T. Cinnamon Oil Inhibits *Penicillium expansum* Growth by Disturbing the Carbohydrate Metabolic Process. *J Fungi (Basel)*. 2021 Feb 9;7(2):123. doi: 10.3390/jof7020123. PMID: 33572180; PMCID: PMC7915993.
- [2] Xie D, Lei Y, Sun Y, Li X, Zheng J. Regulation of fructose levels on carbon flow and metabolites in yeast during food fermentation. *Food Sci Technol Int*. 2023 May 31:10820132231179495. doi: 10.1177/10820132231179495. Epub ahead of print. PMID: 37259509.
- [3] Wang X, Qin Y, Li X, Yan B, Martyniuk CJ. Comprehensive Interrogation of Metabolic and Bioenergetic Responses of Early-Staged Zebrafish (*Danio rerio*) to a Commercial Copper Hydroxide Nanopesticide. *Environ Sci Technol*. 2021 Oct 5;55(19):13033-13044. doi: 10.1021/acs.est.1c04431. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34553928.
- [4] Yang X, Zhou P, Zhao Z, Li J, Fan Z, Li X, Cui Z, Fu A. Improvement Effect of Mitotherapy on the Cognitive Ability of Alzheimer's Disease through NAD⁺/SIRT1-Mediated Autophagy. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Nov 16;12(11):2006. doi: 10.3390/antiox12112006. PMID: 38001859; PMCID: PMC10669341.
- [5] Tang Q, Ding C, Xu Q, Bai Y, Xu Q, Wang K, Fang M. Mitochondrial Fusion Potentially Regulates a Metabolic Change in Tibetan Chicken Embryonic Brain During Hypoxia. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 9;9:585166. doi: 10.3389/fcell.2021.585166. PMID: 33634113; PMCID: PMC7900496.

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

