

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1017

产品规格: 50管/48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60mL×1瓶	4℃
试剂二	液体0.6mL×1瓶	-20℃
试剂三	液体55mL×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2mL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、水浴锅、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 (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. 分光光度计预热30min以上, 调节波长至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后取出比色皿, 再依次加入40 μ L试剂八和60 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 ΔA 空白



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

=A2-A1。

3. 测定管:

取1mL工作液加入1mL石英比色皿, 在37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 孵育5min后取出比色皿, 再依次加入40 μ L试剂八和60 μ L样本, 混匀并立即测量340nm处0s的吸光值A3, 37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 中准确反应2min, 记录340nm处2min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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A\text{测定} - \Delta A\text{空白}) \div (\epsilon \times d) \times V\text{反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V\text{样}) \div T \\ = 1473.7 \times (\Delta A\text{测定} - \Delta A\text{空白}) \div Cpr$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A\text{测定} - \Delta A\text{空白}) \div (\epsilon \times d) \times V\text{反总} \times 10^9] \div (V\text{样} \div V\text{样总} \times 500) \div T \\ = 2.977 \times (\Delta A\text{测定} - \Delta A\text{空白})$$

V反总: 反应体系总体积, 1.1×10^{-3} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 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; 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°C或25°C, 取小烧杯一只装入一定量的37°C或25°C蒸馏水, 将此烧杯放入37°C或25°C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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com