

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K083-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience[®] α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)

比色法测试盒

α -Ketoglutarate Dehydrogenase(α -KGDH)

Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清血浆、动植物组织样本中的 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 的酶活。

检测原理

α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)是三羧酸循环中一个关键酶, α -KGDH 催化底物与 NAD^+ 转化为 NADH 与产物, 同时 NADH 通过递氢物质将 WST-8 转化为显色物质, 在 450 nm 波长下检测其吸光度可以反应 α -KGDH 的活力。

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	55 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	28 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	澄清剂 (Clarificant)	3 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm, 最佳检测波长为 450 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 反应工作液的配制：

取一瓶试剂二溶液加入试剂三瓶中，混匀溶解，2-8℃可避光保存6h。

③ 0.5 mmol/L 标准品配制：

取一支试剂六加入 2 mL 双蒸水，混匀，得到 0.5 mmol/L 的标准品溶液，2-8℃避光保存6h。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.1	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.5
0.5 mmol/L 标准品(μ L)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μ L)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：匀浆介质为试剂一，匀浆后离心取上清，留取部分样本上清用于蛋白浓度测定。

血清(浆)等液体样品：直接测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：8.3-42.3 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释
10%小鼠肝组织	不稀释	10%绿萝叶片组织	不稀释
10%小鼠脾组织	不稀释	大鼠血浆	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

试剂准备时，配制后的反应工作液需确保粉剂完全溶解。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液加入标准孔中，
测定孔：取 20 μL 待测样本加入测定孔中，
对照孔：取 20 μL 待测样本加入对照孔中。
- ② 向步骤①中标准孔与测定孔加入 200 μL 反应工作液，
向步骤①中对照孔加入 200 μL 双蒸水。
- ③ 向步骤②中各孔加入 20 μL 试剂四，
- ④ 振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min。
- ⑤ 向步骤④中加入 20 μL 试剂五。
- ⑥ 振板 3 s，酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--	
待测样本(μL)	--	20	20
反应工作液(μL)	200	200	
双蒸水(μL)			200
试剂四(μL)	20	20	20
振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min。			
试剂五(μL)	20	20	20
振板 3 s，酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中 α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)活力计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol NADH 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times 1000 \div C_{\text{pr}} \times f$$

血清血浆样本 α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDH)活力计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每升血清血浆样本每分钟催化底物产生 1 μmol NADH 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活力 (U/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times 1000 \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

T: 反应时间 10 min

ΔA_{450} : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度 gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

1000: 1 mmol = 1000 μmol

附录 1 关键数据

1. 技术参数

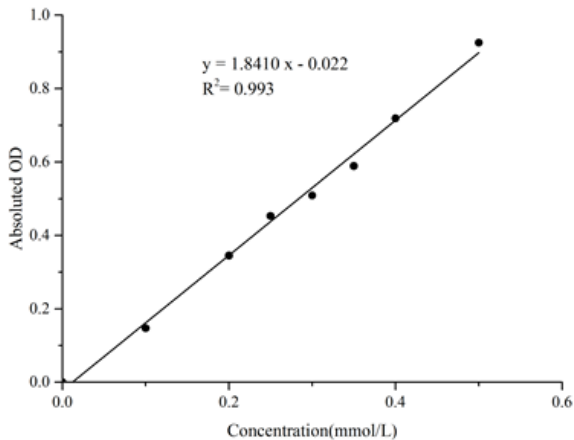
检测范围	8.3-42.3 U/L	平均批间差	8.5 %
灵敏度	8.3 U/L	平均批内差	1.5 %
平均回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量 20 μ L, 按照操作步骤进行实验, OD 值如下表所示:

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.5
OD 值	0.087	0.236	0.419	0.521	0.599	0.752	0.811	1.038
	0.096	0.241	0.454	0.569	0.603	0.610	0.811	0.996
平均 OD 值	0.091	0.238	0.436	0.545	0.601	0.681	0.811	1.017
绝对 OD 值	0	0.147	0.345	0.453	0.509	0.589	0.719	0.925

② 绘制标曲(如下图):



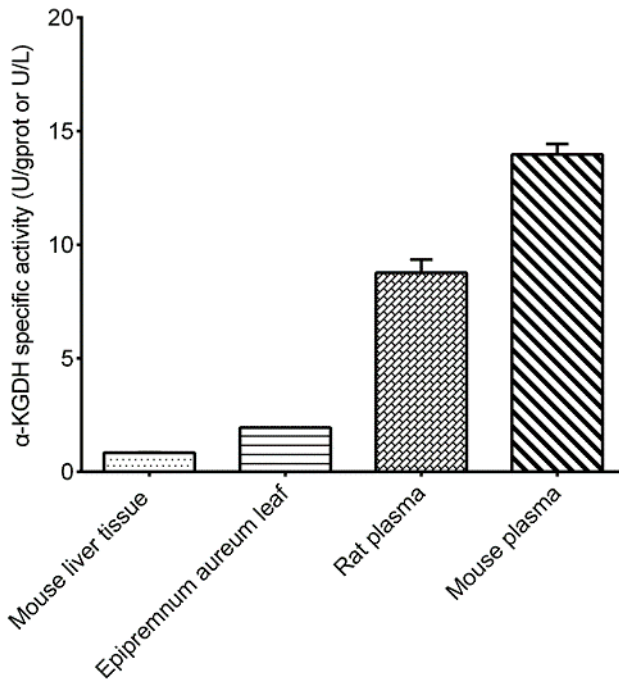
附录 2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取 10%小鼠肝组织匀浆上清 20 μL , 按说明书操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 1.7013x - 0.0006$, 对照孔 OD 值为 0.113, 测定孔 OD 值为 0.397, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为 13.89 gprot/L 计算结果如下:

$$\begin{aligned}\alpha\text{-KGDH活力(U/gprot)} &= (0.397 - 0.113 + 0.0006) \div 1.7013 \div 10 \times 1000 \div 13.89 \\ &= 1.20 \text{ U/gprot}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定 10%小鼠肝组织(蛋白浓度 13.89 gprot/L, 加样量 20 μL)、10%绿萝组织(蛋白浓度 3.63 gprot/L, 加样量 20 μL)、大鼠血浆(加样量 20 μL)、小鼠血浆(加样量为 20 μL)中的 $\alpha\text{-KGDH}$ 酶活(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

