

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

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。

组成:

| 产品名称 | KC001-50T/48S | Storage |
|---------|---------------|---------|
| 试剂一: 液体 | 50ml | -20°C |
| 试剂二: 液体 | 10ml | -20°C |
| 试剂三: 液体 | 1ml | -20°C |
| 试剂四: 液体 | 55.5ml | 4°C |
| 试剂五: 粉剂 | 1 支 | 4°C |
| 试剂六: 粉剂 | 1 支 | 4°C |
| 试剂七: 粉剂 | 1 支 | 4°C |
| 试剂八: 粉剂 | 1 支 | 4°C |
| 试剂九: 粉剂 | 1 支 | -20°C |
| 试剂十: 粉剂 | 1 支 | -20°C |
| 说明书 | 一份 | |

试剂十: 粉剂 \times 1 支, -20°C 保存; 临用前加入 2.1ml 蒸馏水充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

工作液的配制: 临用前把试剂五、试剂六、试剂七、试剂八和试剂九转移到试剂四中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。



自备仪器和用品：

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、冰和蒸馏水。

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1ml 试剂一和 10 μ l 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4 $^{\circ}$ C 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min。
- 4、上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 α -KGDH（此步可选做）。
- 5、在步骤④的沉淀中加入 200 μ l 试剂二和 2 μ l 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），用于线粒体 α -KGDH 活性测定。

测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm 处，蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 5min。
- 3、在 1ml 石英比色皿中依次加入 40 μ l 试剂十、60 μ l 样本和 1.1ml 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1 和 2min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

α -KGDH 活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 325 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.65 \times \Delta A$$

V_{反总}：反应体系总体积，1.2 $\times 10^{-3}$ L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V_样：加入样本体积，0.06 ml；V_{样总}：加入提取液体积，0.202 ml；T：反应时间，2min；C_{pr}：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。

