

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

注 意：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。

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、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：1mL×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：液体 55.5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 支，4℃ 保存；

试剂六：粉剂×1 支，4℃ 保存；

试剂七：粉剂×1 支，4℃ 保存；

试剂八：粉剂×1 支，4℃ 保存；

试剂九：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

试剂十：粉剂×1 支，-20℃ 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℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融。

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℃ 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。
- 3、在 1mL 石英比色皿中依次加入 40μL 试剂十、60μL 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 $\Delta A=A2-A1$ 。

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， 1.2×10^{-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，0.06 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；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。