

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：100mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：20mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：1.5mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 在试剂五中加入 18mL 试剂四充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min；现配现用；

(2) 在试剂六中加入 1mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂六和 180 μ L 试剂五，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

α-KGDH 活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

(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。

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

(2) 按样本鲜重计算:

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

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

(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, 2×10^{-4} 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, 0.01 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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 650 \times \Delta A \div W$$

(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 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.3 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。
