

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

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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\alpha\text{-KGDH (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 325 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.65 \times \Delta A$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 650 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.3 \times \Delta A$$

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。