

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

α-酮戊二酸脱氢酶（α-KGDH）活性检测试剂盒说明书 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品说明：

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。

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 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	-20℃保存	
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂七	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂八	粉剂×1 支	-20℃避光保存	临用前加入 0.8mL 双蒸水充分混匀待用，用不完的试剂仍-20℃保存。
工作液的配制： 临用前把试剂四、试剂五、试剂六、试剂七转移到试剂三中混合溶解待用。			

操作步骤:

一、 α -KGDH 的提取

称取约 0.1g 组织或收集约 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂二, 冰浴用匀浆器或研钵充分研磨, 4 °C 11000 g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

二、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。

1 空白管:

取 200 μ L 工作液加入微量石英比色皿或 96 孔板中, 37°C 孵育 5min 后取出比色皿, 再依次加入 8 μ L 试剂八和 12 μ L 蒸馏水, 混匀并立即测量 340nm 处 0s 的吸光值 A1, 37°C 准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min 时的吸光值 A2, 计算 ΔA 空白=A2-A1。

2 测定管:

取 200 μ L 工作液加入微量石英比色皿或 96 孔板中, 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min 后取出比色皿, 再依次加入 8 μ L 试剂八和 12 μ L 样本, 混匀并立即测量 340nm 处 0s 的吸光值 A3, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 中准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min 时的吸光值 A4, 计算 ΔA 测定=A4-A3。

三、 α -KGDH 活性计算

• 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 1473.7 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 1488.5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T = 2.977 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.2 $\times 10^{-4}$ 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, 0.012 mL; V 样总: 加入试剂一和试剂二体积, 1.01mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

• 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 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 2456.2 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

(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 定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 2480.7 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

α -KGDH 活性 (U/10⁴ cell) = $[(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T = 4.962 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$

V 反总: 反应体系总体积, 2.2 × 10⁻⁴L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 × 10³L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.6cm; V 样: 加入样本体积, 0.012 mL; V 样总: 加入试剂一和试剂二体积, 1.01 mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意事项:

- 1、测定过程中所有试剂和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 3、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
- 4、测定管的 ΔA 值在 0.01-0.25 之间, 若测定管的 ΔA 值大于 0.25, 需将样本进行稀释。