

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0388

Size: 100T/96S

α 酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、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 (ZC-1036: UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

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°C保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	-20°C保存	
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂×1 支	4°C保存	
试剂五	粉剂×1 支	4°C保存	
试剂六	粉剂×1 支	-20°C保存	
试剂七	粉剂×1 支	-20°C保存	
试剂八	粉剂×1 支	-20°C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°C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。			

五、操作步骤：

1. 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。

2. 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 μL 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 μL 试剂八和 12 μL 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 $\Delta A_{\text{空白}} = A2 - A1$ 。

2) 测定管：

取200 μL 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 μL 试剂八和 12 μL 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A4 - A3$ 。

六、 α -KGDH 活性计算

1. 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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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 1nmol 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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2.2×10^{-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, 0.012 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。

2 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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

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

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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

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

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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (U/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T = 4.962 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

V 反总: 反应体系总体积, $2.2 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;
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。

七、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。