

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-S0661

Size: 50T/48S

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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、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。

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	50mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂二	10mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂三	1mL × 1 支	-20°C 保存	
试剂四	液体 55.5mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉剂 × 1 支	4°C 保存	
试剂六	粉剂 × 1 支	4°C 保存	
试剂七	粉剂 × 1 支	4°C 保存	

试剂八	粉剂×1支	4°C保存	
试剂九	粉剂×1支	-20°C保存	
试剂十	粉剂×1支	-20°C保存	临用前加入 2.1mL 蒸馏水充分混匀待用， 现配现用
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 4°C保存一周。			

五、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10uL试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆600g，4°C离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4°C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200uL试剂二和2uL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。

六、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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）孵育 5min。
- 3、在1mL石英比色皿中依次加入40 μ L试剂十、60 μ L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 $\Delta A=A2-A1$ 。

七、 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。

$$\alpha\text{-KGDH 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.65 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.06 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL；
 T ：反应时间，2min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500