

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。

组成：

产品名称	KC002-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	-20°C
试剂二：液体	20ml	-20°C
试剂三：液体	1.5ml	-20°C
试剂四：液体	20ml	4°C
试剂五：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂六：粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

自备仪器和用品：

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。

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°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）。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



5、在步骤④的沉淀中加入 200μl 试剂二和 2μl 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 10μl 样本、10μl 试剂六和 180μl 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：

(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。

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

(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。

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

(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。

