

α 酮戊二酸脱氢酶(α-KGDH)活性检测试剂盒说明书

α -Ketoglutarate Dehydrogenase Assay Kit

紫外分光光度法

货号：AK284

规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

| 编号 | 规格 | 储存条件 |
|---------|---|---|
| AK284-A | 60mL×1 瓶 | 4℃保存； |
| AK284-B | 0.6mL×1 瓶 | 易挥发试剂，用完后尽快密封；-20℃保存； |
| AK284-C | 60 mL×1 瓶 | 4℃保存； |
| AK284-D | 1.2 mL×1 支 | 4℃保存； |
| AK284-E | 粉剂×2 支 | 4℃保存；临用前取 1 支 AK284-E，加入 1 mL AK284-C，充分溶解，4℃可保存 4 周； |
| AK284-F | 粉剂×2 支 | -20℃保存；提供一个 5 mL 试剂瓶，临用前取 1 支 AK284-F，加入 3 mL AK284-C，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融； |
| AK284-G | 粉剂×2 支 | -20℃保存；临用前取 1 支 AK284-G 加入 1.5 mL AK284-C 充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融； |
| AK284-H | 粉剂×2 支 | -20℃保存；临用前取 1 支 AK284-H，加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融； |
| 工作液配制 | 临用前依次取 22 mL AK284-C、0.5 mL AK284-D、1 mL AK284-E、2.75 mL AK284-F、1.25 mL AK284-G（共 27.5mL，约 27T），充分混合待用，现用现配。 | |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：α-酮戊二酸脱氢酶 (Alpha ketoglutarate dehydrogenase; α-KGDH; AKGDH; 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，是三羧酸循环的关键酶，催化 α-酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰辅酶 A。α-KGDH 对于三羧酸循环的进行，能量代谢的稳定，神经递质的代谢等诸多生理及病理过程极为重要。

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。

自备用品：

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。

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 AK284-A 和 10μL AK284-B，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 然后 11000g，4℃离心 10min，取上清。
3. 上清液即胞浆提取物，置冰上待测。

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. 空白管: 取 1mL 工作液加入 1mL 石英比色皿, 37℃ 孵育 5min 后, 再依次加入 40μL AK284-H 和 60μL 蒸馏水, 立即开始计时 10s, 混匀并立即测量 340nm 处 10s 的吸光值 A1, 37℃ 准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min10s 时的吸光值 A2, 计算 ΔA 空白=A2-A1。空白管只需测 1-2 次。
3. 测定管: 取 1mL 工作液加入 1mL 石英比色皿, 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min 后, 再依次加入 40μL AK284-H 和 60μL 样本, 立即开始计时 10s, 混匀并立即测量 340nm 处 10s 的吸光值 A3, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 中准确反应 2min, 记录 340nm 处 2min10s 时的吸光值 A4, 计算 ΔA 测定=A4-A3。

α -KGDH 活力单位的计算:

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。

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

2. 按样本质量计算

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。

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

3. 按细菌或细胞数量计算

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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 1.1×10^{-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 样: 加入样本体积, 0.06mL; V 样总: 加入 AK284-A 和 AK284-B 体积, 1.01mL; 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; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

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℃ 或 25℃, 取小烧杯一只装入一定量的 37℃ 或 25℃ 蒸馏水, 将此烧杯放入 37℃ 或 25℃ 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。