

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10192

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 55 mL×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 瓶	-20°C保存

溶液的配制:

1. 试剂八: 临用前加入 2 mL 双蒸水充分混匀待用, 用不完的试剂仍-20°C避光保存。
2. 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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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 11000g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上, 调节波长到340nm, 蒸馏水调零。

2、空白管:

取1mL工作液加入1mL石英比色皿, 37°C孵育5min后取出比色皿, 再依次加入40 μ L试剂八和60 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 $\Delta A_{\text{空白}}=A_2-A_1$ 。

3、测定管:

取1mL工作液加入1mL石英比色皿, 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40 μ L试剂八和60 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 $\Delta A_{\text{测定}}=A_4-A_3$ 。

三、 α -KGDH活性计算:

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每mg组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

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。

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

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°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。
- 5、由于提取液中含有一定浓度的蛋白 (约 1mg/mL), 所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例:

- 1、取 0.1g 稗草进行样本处理, 将取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_4-A_3=0.323-0.312=0.011$, $\Delta A_{\text{空白}}=A_2-A_1=0$, 按样本质量计算酶活得:

$$\alpha\text{-KGDH (U/g 质量)} = 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 327.47 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取 0.1g 小鼠肝脏进行样本处理, 4 °C 11000g 离心 10min, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_4-A_3=1.2-0.957=0.243$, $\Delta A_{\text{空白}}=A_2-A_1=0$, 按样本质量计算酶活得:

$$\alpha\text{-KGDH (U/g 质量)} = 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 3617.055 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献:

[1] Jianyun Yue, Changjian Du, Jing Ji, et al. Inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase activity affects adventitious root growth in poplar via changes in GABA shunt. *Planta*. July 2018; (IF3.06)

[2] Xiao Li, Qi Zhao, Jianni Qi, et al. lncRNA Ftx promotes aerobic glycolysis and tumor progression through the PPAR γ pathway in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*. May 2018; (IF3.571)

参考文献:

[1] Park L C H, Calingasan N Y, Sheu K F R, et al. Quantitative α -ketoglutarate dehydrogenase activity staining in brain sections and in cultured cells[J]. *Analytical biochemistry*, 2000, 277(1): 86-93.