

α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0715

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 0.6 mL×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 28 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 0.5 mL×1 支	2-8°C保存
试剂五	粉剂×2 支	2-8°C保存
试剂六	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂七	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂八	粉剂×2 支	-20°C保存

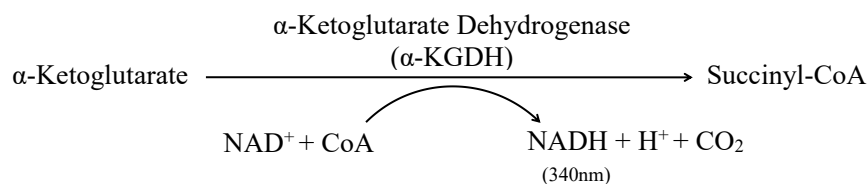
溶液的配制：

1. 试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20°C保存；
2. 试剂五：临用前取 1 支试剂五，加入 1 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂 2-8°C保存 4 周；
3. 试剂六：临用前取 1 支试剂六，加入 1.5 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
4. 试剂七：临用前取 1 支试剂七，加入 1 mL 试剂三，充分溶解，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融（1 支粉剂溶解后可做 100T，为了延长使用时间，此产品多给 1 支粉剂）；
5. 试剂八：临用前取 1 支试剂八，加入 0.4mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
6. 工作液的配制：临用前依次取 8.05 mL 试剂三、0.2 mL 试剂四、1 mL 试剂五、1.25 mL 试剂六、0.5 mL 试剂七（共 11mL，约 55T），充分混合待用，现用现配。

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340nm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/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、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 $^{\circ}$ C 11000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、操作步骤

1、紫外分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计需用蒸馏水调零。

2、空白管：

取200 μ L工作液加入微量石英比色皿或96孔UV板中，37 $^{\circ}$ C孵育5min后，再依次加入8 μ L试剂八和12 μ L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 $^{\circ}$ C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200 μ L工作液加入微量石英比色皿或96孔UV板中，在37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育5min后，再依次加入8 μ L试剂八和12 μ L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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ C（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。

三、 α -KGDH活性计算

a.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。

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

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。

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

V反总：反应体系总体积，2.2 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：NADH摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.012mL；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，1mol=10 9 nmol。

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。

$$\alpha\text{-KGDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 2456.2 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

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定义为一个酶活性单位。

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

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定义为一个酶活性单位。

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

V反总: 反应体系总体积, 2.2×10^{-4} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 96孔板光径, 0.6cm; V样: 加入样本体积, 0.012mL; 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, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定 $= A_4 - A_3 = 0.3243 - 0.3115 = 0.0128$, ΔA 空白 $= A_2 - A_1 = 0$, 按样本质量计算酶活得:
 $\alpha\text{-KGDH 活性 (U/g 质量)} = 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times 2$ (稀释倍数) $= 381.056$ 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, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定 $= A_4 - A_3 = 1.2123 - 0.9623 = 0.2500$, ΔA 空白 $= A_2 - A_1 = 0$, 按样本质量计算酶活得:
 $\alpha\text{-KGDH 活性 (U/g 质量)} = 1488.5 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 3721.25$ 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:

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.

相关系列产品:

- BC2150/BC2155 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒
- BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
- BC2160/BC2165 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒