

## $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$ -KGDH) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

**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：**BC0710

**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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 1.2 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

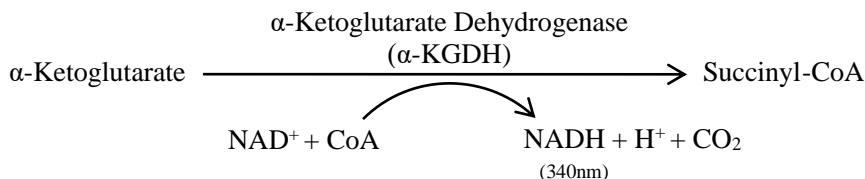
溶液的配制：

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，可 2-8°C保存 4 周；
3. 试剂六：提供一个 5 mL 试剂瓶，临用前取 1 支试剂六，加入 3 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 1.5 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；
5. 试剂八：临用前取 1 支试剂八，加入 1 mL 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 22 mL 试剂三、0.5 mL 试剂四、1 mL 试剂五、2.75 mL 试剂六、1.25 mL 试剂七（共 27.5mL，约 27T），充分混合待用，现用现配。

**产品说明：**

$\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰辅酶A。

$\alpha$ -KGDH催化 $\alpha$ -酮戊二酸、NAD<sup>+</sup>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 $\alpha$ -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/恒温培养箱、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 $\mu$ 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、测定步骤

1、紫外分光光度计预热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 $^{\circ}$ C孵育5min后，再依次加入40 $\mu$ L试剂八和60 $\mu$ 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 $\Delta A$ 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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育5min后，再依次加入40 $\mu$ L试剂八和60 $\mu$ 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 $\Delta A$ 测定=A4-A3。

#### 三、 $\alpha$ -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 $\times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：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，0.06mL；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，1mol=10 $^9$ 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  $\Delta A$  值在 0.01-0.25 之间，若测定管的  $\Delta A$  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  $\Delta A$  测定 =  $A_4 - A_3 = 0.323 - 0.312 = 0.011$ ， $\Delta A$  空白 =  $A_2 - A_1 = 0$ ，按样本质量计算酶活得：  
 $\alpha$ -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) = 327.47 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  $\Delta A$  测定 =  $A_4 - A_3 = 1.2 - 0.957 = 0.243$ ， $\Delta A$  空白 =  $A_2 - A_1 = 0$ ，按样本质量计算酶活得：  
 $\alpha$ -KGDH 活性 (U/g 质量) =  $1488.5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 3617.055$  U/g 质量。

### 相关发表文献:

- [1] Jianyun Yue, Changjian Du, Jing Ji, et al. Inhibition of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity affects adventitious root growth in poplar via changes in GABA shunt. *Planta*. July 2018; (IF3.06)
- [2] Xiao Li, Qi Zhao, Gianni Qi, et al. lncRNA Ftx promotes aerobic glycolysis and tumor progression through the PPAR $\gamma$  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  $\alpha$ -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

