

## 转氢酶-2 活性检测试剂盒

### Transhydrogenase-2 Assay Kit

分光光度法

货号: AK256

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK256-A	50 mL×1 瓶	-20℃保存;
AK256-B	25 mL×1 瓶	-20℃保存;
AK256-C	25 mL×2 瓶	4℃保存。
AK256-D	粉剂×2 支	-20℃保存;
AK256-E	粉剂×2 支	-20℃保存;

※ 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: 线粒体转氢酶-2 (Mitochondrial hydrogenase-2, TH-2) 位于线粒体的内膜上, 又称为线粒体复合体六, 催化  $\text{NADH}^+ \text{NADP}^+$  和  $\text{NAD}^{++} \text{NADPH}$  相互转化, 调节线粒体  $\text{NAD(H)}$  和  $\text{NADP(H)}$  平衡。把逆向反应称为 TH-2, 催化  $\text{NADPH}$  和  $\text{NAD}^+$  生成  $\text{NADP}^+$  和  $\text{NADH}$ 。

原理:  $\text{NADH}$  和  $\text{NADPH}$  均在 340nm 有特征吸收, 因此 TH 催化的转氢反应不能导致 340nm 吸光度发生变化。用人工合成底物 3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸 ( $\text{APAD}^+$ ) 替代  $\text{NAD}^+$ , TH-2 催化  $\text{APAD}^+$  还原生成  $\text{APADH}$ ,  $\text{APADH}$  在 375nm 有特征光吸收, 测定 375nm 光吸收的增加速率, 来计算 TH-2 活性。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样品的制备:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL AK256-A, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆液 600g, 4℃离心 5min。
3. 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
4. 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的 TH-2 (此步可选做)。
5. 步骤 4 中的沉淀即为线粒体, 加入 500uL AK256-B, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于 TH-2 活性测定。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 375 nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液的配制: 临用前取 AK256-C、D、E 各一支, 将 AK256-D、E 转移到 AK256-C 中混合溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 现配现用;
3. 在 1mL 玻璃比色皿中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样品	100
工作液	1000
混匀, 立即记录 375 nm 处初始吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

TH-2 含量计算公式:

(1) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g 组织每分钟产生1 nmol APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 82 \times \Delta A \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 164 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

(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产生1 nmol APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.164 \times \Delta A$$

**注：**V 反总：反应体系总体积， $1.1 \times 10^{-3} \text{ L}$ ； $\epsilon$ ：APADH 摩尔消光系数， $6.7 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，0.5mL；T：反应时间，10 min；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。