

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 NADH⁺ NADP⁺ 和 NAD⁺⁺ NADPH 相互转化，调节线粒体 NAD(H) 和 NADP(H) 平衡。把逆向反应称为 TH-2，催化 NADPH 和 NAD⁺ 生成 NADP⁺ 和 NADH。

原理：NADH 和 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-乙酰毗啶腺嘌呤二核苷酸 (APAD⁺) 替代 NAD⁺，TH-2 催化 APAD⁺ 还原生成 APADH，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

- 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。
- 将匀浆液 600g, 4℃离心 5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g, 4℃离心 10min。
- 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）。
- 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：

- 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。
- 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；
- 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。

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

※ 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， 1.1×10^{-3} L； ϵ ：APADH 摩尔消光系数， 6.7×10^3 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。