

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 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-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸 (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 玻璃比色皿、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。

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

(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。

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

※ 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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1.1 \times 10^{-3} \text{L}$; ϵ : APADH 摩尔消光系数, $6.7 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 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。