

转氢酶-2 活性检测试剂盒

Transhydrogenase-2 Assay Kit

微量法

货号: AK257

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK257-A	100 mL×1 瓶	-20℃保存;
AK257-B	50 mL×1 瓶	-20℃保存;
AK257-C	18 mL×1 瓶	4℃保存。
AK257-D	粉剂×1 支	-20℃保存;
AK257-E	粉剂×1 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 AK257-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 AK257-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: 临用前将 AK257-D, E 转移到 AK257-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 微量石英比色皿或 96 孔板中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样品	20
工作液	180
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：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 74.5 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 149 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.149 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，0.5mL；T：反应时间，10min；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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 149 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 298 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.298 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：APADH 摩尔消光系数， 6.7×10^3 L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；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。