线粒体转氢酶-2 活性检测试剂盒

Mitochondrial Transhydrogenase-2 Activity Assay Kit

北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Catalog Number **AKOP003M**
Storage Temperature **-20°C**
Size **100T/48S**

线粒体转氢酶-2 活性检测试剂盒

Mitochondrial Transhydrogenase-2 Activity Assay Kit

一、产品描述

线粒体转氢酶位于线粒体的内膜上，可催化 NADH 和 $NADP^+$与 NAD^+和 NADPH 之间的相互转化，催化逆向反应称为线粒体转氢酶-2（TH-2），促进 NADPH 转换为 NADH，从而提高线粒体的抗氧化能力。

线粒体转氢酶-2 能够催化 $APAD^+$（3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸磷酸）还原生成的 APADH，产物在 375 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的增加速率即可表征线粒体转氢酶-2 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存	**使用前加入 4 mL 试剂三充分溶解** （分装后-20℃可保存 2 周，避免反复冻融）
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	**使用前加入 8 mL 试剂三充分溶解** （分装后-20℃可保存 4 周，避免反复冻融）
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	-

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴和蒸馏水。

1.样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 0.1 g 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4℃ 600 g 离心 10 min，弃沉淀，**留上清**；

②取匀浆液离心上清液移至另一离心管中，4℃ 11000 g 离心 15 min；

③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的转氢酶-2（此步可选做）。

④步骤②离心后沉淀中加入 800 μL 提取液，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为**粗酶液**，用于线粒体转氢酶-2 活性测定。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 375 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（μL）	对照组（μL）
试剂一	80	-
试剂二	80	80
粗酶液	20	20
试剂三	20	100

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时 375 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确反应 130 s，测定 190 s 时 375 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 对照=A2 对照-A1 对照，ΔA=ΔA 测定-ΔA 对照。注：每个样品均需设一个对照组。

3.线粒体转氢酶-2 活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol APADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TH-2（U/mg prot）} = \frac{\Delta A \times V_{反总}}{\varepsilon \times d_1 \times Cpr \times V_{样} \times T} = \frac{995 \times \Delta A}{Cpr}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol APADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TH-2（U/mg prot）} = \frac{\Delta A \times V_{反总}}{\varepsilon \times d_2 \times Cpr \times V_{样} \times T} = \frac{498 \times \Delta A}{Cpr}$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积，0.2 mL；ε：APADH 摩尔消光系数，6.7×10^{-3} mL/nmol/cm；d_1：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；d_2：微量石英比色皿光径，1 cm；T：反应时间，3 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

四、注意事项

①若 A2 测定大于 1.2 或ΔA 大于 0.2 时，建议将提取液稀释后再进行测定，计算时相应修改；

②提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样本蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量；

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

③准确在规定时间点完成吸光值的测定，以保证结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板测定，应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；

⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若使用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。

附：使用组织样本质量计算的公式

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

单位定义：每 g 组织每分钟催化生成 1 nmol APADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中 TH-2（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提}}{\varepsilon \times d_1 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{995 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中 TH-2（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总}}{\varepsilon \times d_1 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{796 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{TH-2（U/g）=上清中 TH-2+沉淀中 TH-2} = \frac{995 \times \Delta A1}{W} + \frac{796 \times \Delta A2}{W}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

单位定义：每 g 组织每分钟催化生成 1 nmol APADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中 TH-2（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提}}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{498 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中 TH-2（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总}}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{398 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{TH-2（U/g）=上清中 TH-2+沉淀中 TH-2} = \frac{498 \times \Delta A1}{W} + \frac{398 \times \Delta A2}{W}$$

注释：$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2 mL；$V_{样}$：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；$V_{提}$：待测样本总体积，1 mL；$V_{样总}$：沉淀重悬体积，0.8 mL；ε：APADH 摩尔消光系数，6.7×10^{-3} mL/nmol/cm；d_1：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；d_2：微量石英比色皿光径，1 cm；W：组织样本质量，g；T：反应时间，3 min；ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.