CheKine™ 线粒体转氢酶-2（TH-2）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1840　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

转氢酶（TH, EC 7.1.1.1）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。将逆向反应称为 TH-2，催化 NADPH 和 NAD^+生成 $NADP^+$和 NADH。

本试剂盒检测原理是 NADH 和 NADPH 均在 340 nm 有特征吸收，因此 TH 催化的转氢反应不能导致 340 nm 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 375 nm 有特征光吸收，测定 375 nm 光吸收的增加速率，来计算 TH-2 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	60 mL	60 mL×2	-20℃
Reagent Ⅱ	30 mL	60 mL	-20℃
Reagent Ⅲ	10.8 mL	21.6 mL	4℃
Reagent Ⅳ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅴ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 375 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
其他	匀浆器或研钵（组织样本）、水浴锅、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Working Reagent	临用前配制；将 Reagent Ⅳ和 Reagent Ⅴ转移到 Reagent Ⅲ中混合溶解；使用前根据用量取出部分 Working Reagent（每孔 180 μL），置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5 min	未用完的试剂分装后-20℃避光保存一个月，禁止反复冻融

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆，600 g，4℃离心 5 min。弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000 g，4℃离心 10 min。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（可选做）；沉淀即为线粒体，加入 500 μL Reagent Ⅱ，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），用于 TH-2 活性测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 375 nm。
2. **检测体系配制**：在 96 孔 UV 板中按照如下方式操作：

试剂	测定孔（μL）
样本	20
Working Reagent	180

3. **吸光度检测**：混匀，测定 375 nm 处吸光值 A_1 和 10 min 后的吸光值 A_2。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] **>** 进入“**技术中心**”**>** 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_2-A_1$。

2. 样本 TH-2 活性计算

- 按样本质量计算：

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

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

$V_{反总}$：反应总体积，2×10^{-4} L；ε：APADH 摩尔消光系数，6.7×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；$V_{样}$：反应体系中加入样本体积，0.02 mL；$V_{样总}$：加入 Reagent Ⅱ体积，0.5 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，10 min。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 小鼠心脏样本，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得$\Delta A=A_2-A_1=0.820-0.762=0.058$，按样本质量计算得：TH-2 活性 (U/g)=149×ΔA÷W=86.42 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

如果ΔA 小于 0.25 可适当加大样本量。如果ΔA 大于 1.2，样本可用 Reagent Ⅰ或 Reagent Ⅱ进一步稀释，或减少提取用样本量。再重新进行测定。

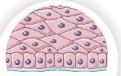
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1851	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅰ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1861	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅱ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1871	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1881	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅳ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1891	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅴ活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™线粒体转氢酶-2（TH-2）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1840）

样本处理



称取约0.1 g样本，加入1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆



600g，4℃离心5 min，弃沉淀，将上清液移至另一离心管中



11000g，4℃离心10 min。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（可选做）；沉淀即为线粒体，加入500 μL Reagent Ⅱ，超声波破碎（冰浴，功率20%或200 W，超声3 s，间隔10 s，重复30次），用于TH-2活性测定



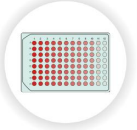
体系配置



样本	20 μL
Working Reagent	180 μL

迅速混匀，测定375 nm处吸光值A1

数据检测



10min后测定375 nm处吸光值A2

结果计算

V1.0