

线粒体转氢酶-1 (TH-1) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

TH 位于线粒体的内膜上, 又称为呼吸电子传递链复合体六, 催化 $\text{NADH} + \text{NADP}^+$ 和 $\text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ 相互转化。催化正向反应称为 TH-1。线粒体 NADH 含量增加时会导致线粒体膜的 H^+ 电化学梯度升高, 因而促进了电子传递链上 ROS 的产生。TH-1 促进 NADH 转换为 NADPH, 从而提高线粒体的抗氧化能力。

测定原理:

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磷酸 (APADP^+) 替代 NADP^+ , TH-1 催化 APADP^+ 还原生成的 APADPH 在 375nm 有特征光吸收, 因此通过测定 375nm 光吸收增加速率, 来计算 TH-1 活性。

试剂的组成和配制:

产品名称	OP018-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	-20°C
试剂二: 液体	25ml	-20°C
试剂三: 液体	25ml	4°C
试剂四: 粉剂	2 支	-20°C
试剂五: 液体	2 支	-20°C
说明书	一份	

需自备的仪器和用品:

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。

样本的前处理:

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 万细菌或细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g, 4°C 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C 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-1 (此步可选做)。
- 5、步骤 4 中的沉淀即为线粒体, 加入 500uL 试剂二, 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-1 活性测定。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 375nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 工作液的配制: 临用前取试剂三、试剂四和试剂五各一支, 将试剂四、五转移到试剂三中混合溶解, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

(2) 在 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μ L 样本和 1000 μ L 工作液, 混匀, 立即记录 375nm 处初始吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

TH-1 活性计算:

(1) 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 APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性 (nmol/min /mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 164 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性 (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 82 \times \Delta A \div W$

(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 APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性 (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.164 \times \Delta A$

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

