

线粒体转氢酶-1 (TH-1) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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	OP019-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	100ml	-20°C
试剂二: 液体	50ml	-20°C
试剂三: 液体	18ml	4°C
试剂四: 粉剂	1 支	-20°C
试剂五: 粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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, 11100g, 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)。

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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网: <http://www.bio149.com>

5、步骤4中的沉淀即为线粒体，加入500 μ L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。

测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热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：临用前将试剂四、五转移到试剂三中混合溶解，置于37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ C（其它物种）水浴5min；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C保存，禁止反复冻融。

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入20 μ L样本和180 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

TH-1 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- (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1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。TH-1 活性 (nmol/min /mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 149 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

- (2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟产生1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。TH-1 活性 (nmol/min /g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 74.5 \times \Delta A \div W$

- (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1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。TH-1 活性 (nmol/min /10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.149 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ 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，0.02 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。

b. 用96孔板测定的计算公式如下

- (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1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。TH-1 活性 (nmol/min /mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 298 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

- (2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟产生1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。TH-1 活性 (nmol/min /g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 149 \times \Delta A \div W$

- (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1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。TH-1 活性 (nmol/min /10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.298 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：APADPH 摩尔消光系数，6.7 $\times 10^3$ 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。

