

转氢酶-1 (TH-1) 检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：液体 50mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 18mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

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℃ 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11100g，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-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。

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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融。
 - (2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20μL 样本和 180μL 工作液，混匀，立即记录 375nm 处初始吸光值 A_1 和 10min 后的吸光值 A_2 ，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 1 nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{TH-1 活性 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 149 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{TH-1 活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 74.5 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{TH-1 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.149 \times \Delta A\end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

ϵ : APADPH 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, 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 1 nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{TH-1 活性 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 298 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{TH-1 活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 149 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{TH-1 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.298 \times \Delta A\end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

ϵ : APADPH 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。