

转氢酶-1 (TH-1) 检测试剂盒 (分光光度法)

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 50mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：液体 25mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 25mL×2 瓶，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×2 支，-20℃ 保存；

试剂五：粉剂×2 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℃ 离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，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 100μL 样本和 1000μL 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。

$$\begin{aligned} \text{TH-1 活性 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 164 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

- (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。

$$\begin{aligned} \text{TH-1 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 82 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

- (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。

$$\begin{aligned} \text{TH-1 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T \\ &= 0.164 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 1.1×10^{-3} 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，0.1 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。