

线粒体转氢酶-2 (TH-2) 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，又称为线粒体复合体六，催化 $\text{NADH}+\text{NADP}^+$ 和 $\text{NAD}^++\text{NADPH}$ 相互转化，调节线粒体 NAD(H) 和 NADP(H) 平衡。把逆向反应称为 TH-2，催化 NADPH 和 NAD^+ 生成 NADP^+ 和 NADH 。

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 (APAD^+) 替代 NAD^+ ，TH-2 催化 APAD^+ 还原生成 APADH ， APADH 在 375nm 有特征光吸收，测定 375nm 光吸收的增加速率，来计算 TH-2 活性。

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。

试剂的组成和配制

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，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-2（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-2 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 20 μL 样本和 180 μL 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-2 活性计算

a. 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 APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 149 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 74.5 \times \Delta A \div W$$

(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 1 nmol APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.149 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：APADH 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 APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 298 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

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

(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 1 nmol APADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.298 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 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。