

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NADH+NADP⁺和NAD⁺⁺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：

- 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。
- 将匀浆600g，4℃离心5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
- 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）。
- 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20μL样本和180μL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ΔA=A2-A1。

TH-2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 APADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{TH-2活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 149 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{TH-2活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 74.5 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{TH-2活性 (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.149 \times \Delta A$$

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。

$$\text{TH-2活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 298 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{TH-2活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 149 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{TH-2活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.298 \times \Delta A$$

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。