

转氢酶-1 (TH-1) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D052 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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 NADH+NADP⁺ 和 NAD⁺⁺+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。

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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 18mL×2 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存	
试剂四	粉剂×2 支	-20°C保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、离心管、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)、96 孔板、酶标仪。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1.0 mL 提取液, 冰浴匀浆, 600 g 4 °C 离心 5min。
- ② 将上清液移至另一离心管中, 4 °C 11000 g 离心 10min, 上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 TH-1 (此步可选做, 可以判断线粒体提取效果)。
- ③ 在沉淀中加入 500uL 试剂一, 超声波破碎 (功率 20%, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于 TH-1 活性测定, 并且用于蛋白含量测定, 蛋白质含量测定需要另外购买相应试剂盒。

【注】:若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 375nm。
- ② 工作液的配制: 临用前取试剂二、试剂三和试剂四各一支, 将试剂三、四转移到一瓶试剂二中混合溶解。这样可以分两批配制工作液, 防止工作液失效, 溶解后的工作液-20°C分装冻存, 两周内用完。
- ③ 按下表在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
-----------	-----

工作液	180
在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min	
样本	20
混匀, 立即记录 375nm 处初始吸光值 A1, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 中准确反应 10min, 记录 375nm 处 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$	

【注】：若 ΔA 小于 0.01, 则可增加样本质量 W, 则改变后的 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算：

(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。

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

(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。

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

(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。

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

W---取样质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

ϵ : APADH 摩尔消光系数, $6.7 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

V 样: 加入样本体积, 0.02mL;

V 样总: 加入提取液体积, 0.5mL;

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

T: 反应时间, 10 min;

d: 96 孔板光径, 0.5cm;

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒