

线粒体转氢酶-2 (TH-2) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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 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, 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-2 (此步可选做)。
- ⑤ 步骤④中的沉淀即为线粒体, 加入 500 μL 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℃ (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 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μL 样本和 1000 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

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 164 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 82 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{TH-2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.164 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $1.1 \times 10^3 \text{ L}$ ； ϵ ：APADH 摩尔消光系数， $6.7 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；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。