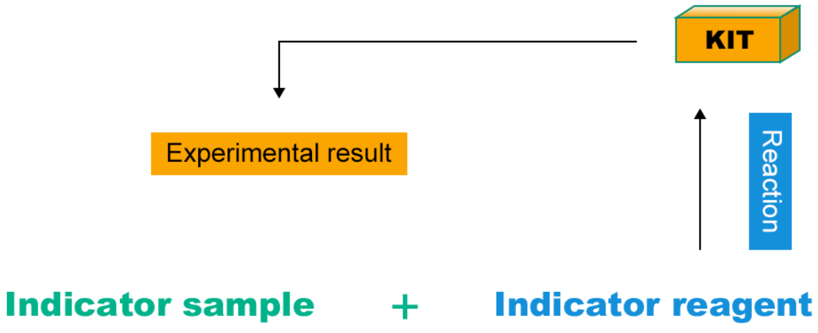
# 上海茁彩生物科技有限公司

# ZCIBIO Technology Co.,Ltd




生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0485　　Size：100T/96S

# 线粒体转氢酶1（TH-1）检测试剂盒说明书

## 微量法

***正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定**

**一、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 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。

**二、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。

**三、需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

**四、试剂的组成和配置：**

| 种类 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|---|---|---|---|
| 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 | |

**五、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，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-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。

**六、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；现配现用；

（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。

**七、TH-1 活性计算：**

- **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 1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(V 样×Cpr)÷T

=149×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算

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

TH-1 活性（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(W× V 样÷V 样总）÷T

=74.5×ΔA÷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 1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性（nmol/min/$10^4$cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.149×ΔA

V 反总：反应体系总体积，2×$10^{-4}$ 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，0.02 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。

- **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 1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(V 样×Cpr)÷T

=298×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算

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

TH-1 活性（nmol/min /g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(W×V 样÷V 样总）÷T

=149×ΔA÷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 1nmol APADPH 定义为一个酶活性单位。

TH-1 活性（nmol/min /$10^4$cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(500×V 样÷V 样总）÷T=0.298×ΔA

V 反总：反应体系总体积，2×$10^{-4}$ L；ε：APADPH 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。