

线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0151	线粒体呼吸链复合体 1 活性检测试剂盒	25 管/24 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 25mL × 1 瓶	-20℃
试剂二	液体 5mL × 1 瓶	-20℃
试剂三	液体 0.5mL × 1 瓶	-20℃
试剂四	液体 25mL × 1 瓶	-20℃
试剂五	液体 1mL × 1 支	-20℃
试剂六	粉剂 × 1 瓶: 使用前加入 2mL 蒸馏水, 现配现用。	-20℃
工作液的配制: 临用前将试剂五转移到试剂四中混合溶解; 现配现用。		

一、产品说明

细胞呼吸链复合体 I (EC1.6.5.3) 又称 NADH-CoQ 还原酶或 NADH 脱氢酶, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 是线粒体内膜中最大的蛋白复合物。该酶催化一对电子从 NADH 传递给 CoQ, 同时可使 O₂ 还原成 O₂⁻, 是呼吸电子传递链上产生 O₂⁻ 的主要部位。测定该酶活性, 不仅可以反映呼吸电子传递链 (ETC) 状态, 而且可以反映活性氧 (ROS) 生成状态。

复合体 I 能够催化 NADH 脱氢生成 NAD⁺, 在 340nm 下测定 NADH 的氧化速率计算出该酶活性的大小。

二、自备材料

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

三、样品制备

1、组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三, 进行冰浴匀浆。600g 4℃ 离心 5min, 取上清, 转移至另一离心管, 11000g 4℃ 离心 10min, 上清液即为去除线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的复合体 I (此步可选做) 吸取上清后留下的沉淀即为线粒体, 加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于复合体 I 酶活性测定。

2、细胞或者细菌: 收集 500 万细菌, 加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三, 进行冰浴匀浆。600g 4℃ 离心 5min, 取上清, 转移至另一离心管, 11000g 4℃ 离心 10min, 上清液即为去除线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的复合体 I (此步可选做) 吸取上清后留下的沉淀即为线粒体, 加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于复合体 I 酶活性测定。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min。
- 3、在 1mL 石英比色皿中加入 40 μ L 样本、800 μ L 工作液和 60 μ L 试剂六, 立即混匀, 记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

五、活性的计算

- 1、按照样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 I 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 1808 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

- 2、按照样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 I 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 365 \times \Delta A \div W$$

- 3、按照细胞/细菌数量计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 I 活力 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.73 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 9 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.04 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL;

T: 反应时间, 2 min; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

六、注意事项

- 1、工作液需要现配现用。
- 2、正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。
- 3、试剂六溶解前, 先短暂离心是, 使试剂全部沉淀至瓶底。