

线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒 (微量法)  
(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
YFX0152	线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒	100 管/96 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL ×1 瓶	-20°C
试剂二	液体 20mL ×1 瓶	-20°C
试剂三	液体 1.5mL ×1 瓶	-20°C
试剂四	液体 25mL ×1 瓶	-20°C
试剂五	液体 1mL ×1 瓶	-20°C
试剂六	粉剂×1 支: 用时加入 2mL 蒸馏水, 现配现用。	-20°C
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

线粒体复合体I (EC 1.6.5. 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O<sub>2</sub>还原生成O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 是呼吸电子传递链上产生O<sub>2</sub><sup>-</sup>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。

线粒体复合体I能够催化NADH脱氢生成 NAD<sup>+</sup>, 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/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。

### 三、样本准备 (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 试剂一和 10uL 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g, 4°C离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C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复合体I (此步可选做)。
- 5、步骤 4 中的沉淀即为线粒体, 加入 200uL 试剂二和 2uL 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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、工作液在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min。

3、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 $\mu$ L 样本、200 $\mu$ L 工作液和 15 $\mu$ L 试剂六, 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、活力的计算

### 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算:

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

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、按照组织样本鲜重计算

酶活定义: 每g组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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、按照细菌/细胞密度计算:

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

复合体I活力 (nmol/min/10<sup>4</sup>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, 2.25 $\times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 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, 0.01 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。

### 用96孔板测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算

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

复合体I活力 (nmol/min/mg prot) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3616 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$ 。

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照组织样本鲜重计算

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

复合体I活力 (nmol/min/g 鲜重) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 730 \times \Delta A \div W$ 。

3、按照细菌/细胞密度计算

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

复合体I活力 (nmol/min/10<sup>4</sup>cell) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.46 \times \Delta A$ 。

V 反总: 反应体系总体积, 2.25 $\times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$  L/mol/cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。