

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 (微量法)	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℃
试剂二	液体 20mL × 1 瓶	-20℃
试剂三	液体 1.5mL × 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 支: 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/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、样品准备

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min。
- 3、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、200μL 工作液和 15μL 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、活性的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

- 1、按照组织蛋白浓度计算

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。

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

需要另外测定蛋白浓度, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

- 2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

- 3、按照细菌/细胞密度计算

单位的定义: 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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2.25×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。

B. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

- 1、按照组织蛋白浓度计算

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。

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

需要另外测定蛋白浓度, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

- 2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmol 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、按照细菌/细胞密度计算

单位的定义: 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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2.25×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。