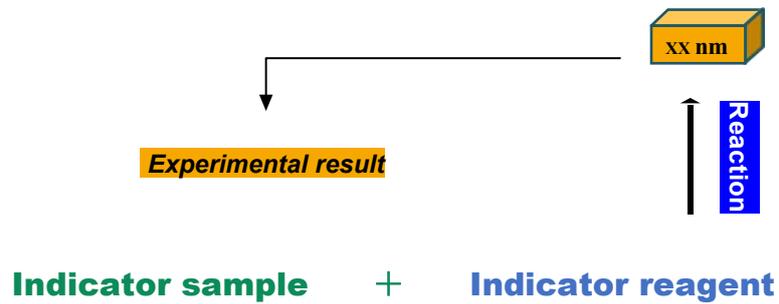


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

线粒体复合体 I 试剂盒说明书 紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

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还原生 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。

测定原理

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。

需自备的仪器和用品

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。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	25mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂二	5mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂三	0.5 mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂四	25mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂五	1 mL × 1 支	-20°C 保存	用时加入 2mL 蒸馏水，现配现用

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；

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。

测定步骤:

1、分光光度计预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 工作液于37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 孵育5min。

(2) 在1mL石英比色皿中加入40 μL样本、800 μL工作液和60 μL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 $\Delta A=A1-A2$ 。

复合体 I 活力单位的计算

(1) 按蛋白浓度计算

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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算

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。

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

(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消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

V 反总: 反应体系总体积, 9×10^{-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, 0.04 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。