

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-S0472

Size: 100T/96S

线粒体呼吸链复合体 I 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：

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_2 还原生成 $O_2^{\cdot-}$, 是呼吸电子传递链上产生 $O_2^{\cdot-}$ 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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品：

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 (ZC-1036: UV 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 20mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1.5mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂五	液体 1mL×1 支	-20℃保存	
试剂六	粉剂×1 支	-20℃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			

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试剂一和10uL试剂三，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，11000g，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。

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340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

- (1) 工作液于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育5min。
- (2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10 μL样本、200 μL工作液和15 μL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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、复合体 I 活力单位的计算

- 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(1) 按蛋白浓度计算

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。

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

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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：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。

- 使用 96 孔板 (UV板) 测定的计算公式如下：

(1) 按蛋白浓度计算

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。

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

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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 0.202 mL;
 T : 反应时间, 2min; W : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万。