

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

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

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O₂还原生成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。

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/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。

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	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		

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。

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°C (哺乳动物) 或25°C (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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

复合体 I 活力单位的计算

a. 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。

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

$$= 0.73 \times \Delta A$$

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。

b. 使用 96 孔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。

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

$$= 1.46 \times \Delta A$$

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。