

线粒体呼吸链复合体 I/NADH-辅酶 Q 还原酶试剂盒说明书

(货号: BP10487W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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^{2-} , 是呼吸电子传递链上产生 O_2^{2-} 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 的氧化速率进而得出该酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20℃ 避光保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃ 避光保存	
试剂五	粉剂 2 支	4℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用。 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂六	液体 20mL×1 瓶	4℃ 避光保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃ 低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。
- ③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 I, 用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀 (线粒体) 中加入 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), 液体置于冰上用于线粒体复合体 I 酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 设定温度 25℃, 调节波长至 340nm。

- ② 若待测上清液比较浑浊（蛋白浓度比较高），可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量（试剂六相应增加）进行预测定实验。
- ③ 将试剂四和五和六置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	170
样本	10
混匀，立即于 340nm 处读取 A1，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），10min 后读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】 1. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积 V1（如增至 20μL，试剂六相应减少），则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
3. 若 ΔA 的值大于 0.15，则需减少反应时间 T（如减至 5min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

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

复合体 I 活力(nmol/min /mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (V1 × Cpr) ÷ T = 643.1 × $\Delta A \div Cpr$

2、按样本鲜重计算：

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

复合体 I 活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (W × V1 ÷ V) ÷ T = 130 × $\Delta A \div W$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

复合体 I 活力(nmol/min/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (500 × V1 ÷ V) ÷ T = 0.26 × ΔA

4、按液体体积计算：

酶活定义：每 mL 液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活力(nmol/min/mL)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (V1 ÷ V) ÷ T = 130 × ΔA

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；

d---光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。