

## 线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1393

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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O<sub>2</sub>还原生成O<sup>2-</sup>，是呼吸电子传递链上产生O<sup>2-</sup>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<sup>+</sup>，在340nm下测定NADH的氧化速率计算出该酶活性的大小。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体75mL×2瓶	4℃
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	4℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入1mL丙酮；
2. 试剂三：溶于1mL丙酮，可分装后-20℃保存。临用前再用丙酮100倍稀释后使用，现用现配；
3. 试剂四：临用前加入2mL蒸馏水，现配现用；
4. 工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三1:1混合，现配现用。

### 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（UV版）、研钵/匀浆器、丙酮、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0mL提取液，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
2. 4℃ 600g离心10min。将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000g离心15min。
3. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体 I（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
4. 在沉淀中加入400μL提取液，超声波破碎（功率20%，超声5秒，间隔10秒，重复15次），用于复合体 I 酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

#### 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）预热15min。
3. 操作表：在微量石英比色皿/96孔板（UV版）中分别加入

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂一	154



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

工作液	20
试剂四	16
<p>将上述试剂分别加入比色皿/96孔板后迅速吹打混匀，记录第10s的吸光值A1，尽量在37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）环境中准确反应2分钟，之后迅速取出，记录2min时的吸光度A2，计算<math>\Delta A = A1 - A2</math>。</p>	

### 三、复合体 I 活力单位的计算

#### 1. 以微量石英比色皿计算：

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活力 (U/mg prot) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### 2. 以96孔板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。

#### 注意事项：

1. 为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于1.5），可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若 $\Delta A$ 大于0.4，需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数）；若 $\Delta A$ 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
2. 样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。
3. 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
4. 本试剂盒试剂足够完成100管反应。
5. 附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为100T/48S）

#### A、上清中复合体I活力的计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

复合体I活性 (U/g质量) =  $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A1 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值；V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V提取：加入提取液体积，1mL；V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min；W：样本重量，g； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### B、沉淀中复合体I活力的计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

复合体I活性 (U/g质量) =  $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 643 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A2$ ：沉淀测定值；V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V提取：沉淀重悬体积，0.4mL；V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min；W：样本重量，g； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### C、样本复合体I总活力的计算：

样本复合体I总活力即为上清中复合体I活力与沉淀中复合体I活力之和。

按样本质量计算：复合体I (U/g质量) =  $1608 \times \Delta A1 \div W + 643 \times \Delta A2 \div W$

#### D、以96孔板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com