

线粒体复合体 I 试剂盒

货号:GM25024

一、产品简介:

复合体 I 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-} , 是呼吸电子传递链上产生 O_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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mLx1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 6mLx1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 0.5mLx1 支	4℃ 保存	
试剂四	液体 1mLx1	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 x2 支	4℃ 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂六	液体 22mLx1 瓶	4℃ 保存	

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体 I 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

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℃x700g 离心 10min。
- ②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃x12000g 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 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), 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(10⁴):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ①可见分光光度计预热 30min 以上, 设定温度 25℃, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 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 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂四	40
试剂	40
试剂	680
样本	40
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(如增至 60μL，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 0.25，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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 1 活力(nmol/min /mg prot)=[$\Delta A \div (\text{exd}) \times V2 \times 109$]+($V1 \times \text{Cpr}$) +T=321.5 $\times \Delta A$ +Cpr

2、按样本鲜重计算:

酶活定义:每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\text{exd}) \times V2 \times 109$]+($W \times V1 + V$) $\div T$ =65 $\times \Delta A \div W$

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 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

复合体 I 活力(nmol/min/104 cell)=[$\Delta A \div (\text{exd}) \times V2 \times 10$] $\div (500 \times V1 + V) \div T$ =0.13 $\times \Delta A$

E—NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm;

d—光径，1cm;

V—加入提取液体积，0.202mL;

V1—加入样本体积，0.04mL;

V2—反应体系总体积，8 $\times 10^4$ 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。

官方网址：<http://www.genscion.com.cn>

订货热线：4006169114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

