北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

线粒体复合体Ⅰ试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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 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。

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

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；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

工作液的配制：临用前将试剂五转移到试剂四中混合溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

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℃（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 10μL 样本、200μL 工作液和 15μL 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 ΔA=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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅰ活力（nmol/min /mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=1808×ΔA÷Cpr

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅰ活力（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T=365×ΔA÷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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅰ活力(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T=0.73×ΔA

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅰ活力（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=3616×ΔA÷Cpr

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅰ活力（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T=730×ΔA÷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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅰ活力（nmol/min/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T=1.46×ΔA

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。

