

线粒体呼吸链复合体I/NADH-CoQ 还原酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 75 mL×2 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 22 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一支加入 1 mL 丙酮，充分溶解，2-8℃可保存 1 个月（1 瓶粉剂即可做 100T，为延长试剂盒使用时间，故此产品多给一支）；
- 2、试剂三：临用前加入 0.1mL 丙酮，丙酮易挥发，使用完毕后注意封口，-20℃可保存 2 个月；
- 3、试剂三工作液：临用前根据用量将试剂三：丙酮=5μL：0.5mL（约 50T）混合备用，现用现配；
- 4、试剂四：临用前取一支加入 1.6mL 蒸馏水（约 100T），充分溶解，-20℃可保存 1 个月，避免反复冻融（1 瓶粉剂即可做 100T，为延长试剂盒使用时间，故此产品多给一支）；
- 5、工作液的配制：根据用量将丙酮：试剂二：试剂三工作液=250μL：250μL：500μL（约 50T）混合备用，现配现用。

产品说明：

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。

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。



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。

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/恒温培养箱、可调式移液器、微量石英比色皿/ 96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、细胞超声破碎仪、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 1.0 mL 提取液一，用匀浆器或研钵于冰上快速匀浆（约 30 次）。
2. 4℃ 600 g 离心 10min，弃沉淀，留上清。上清再次离心，4℃ 11000 g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
3. 上一步结果得到的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 200μL 提取液一和 200μL 提取液二，超声波破碎（功率 200W，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，分光光度计蒸馏水调零。
2. 试剂一37℃预热15min。
3. 操作表：在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入

试剂名称（μL）	测定管
样本	10
试剂一	154
工作液	20
试剂四	16
充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃水浴1min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），拿出迅速擦干测定1min10s时的吸光值A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

三、复合体I活力单位的计算

1. 以微量玻璃比色皿计算：

（1）按样本蛋白浓度计算

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) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

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（A1 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 ΔA 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 ΔA 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（约 0.5mg/mL）。
3. 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活。另附按样本计算公式和按细胞数量计算公式
4. 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) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div W$

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) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液一体积，1mL； $V_{\text{重悬}}$ ：沉淀重悬体积（0.2mL 提取液一+0.2mL 提取液二），0.4mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； T ：反应时间，1min； W ：样本质量，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) = $3215.43 \times \Delta A1 \div W + 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

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。

5. 附：使用细胞数量计算公式：（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 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活性 (U/ 10^6 cell) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div N$

B、沉淀中复合体 I 活力的计算：

单位的定义：每 10^6 个细胞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/ 10^6 cell) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div N$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液一体积，1mL； $V_{\text{重悬}}$ ：沉淀重悬体积（0.2mL 提取液一+0.2mL 提取液二），0.4mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； T ：反应时间，1min； N ：细胞数量，以 10^6 计； 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。

复合体 I 总活性 (U/ 10^6 cell) = $3215.43 \times \Delta A1 \div N + 1286.17 \times \Delta A2 \div N$

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。