

线粒体复合体 I 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注意：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°C 保存;
- 试剂二：液体 20mL×1 瓶, -20°C 保存;
- 试剂三：液体 1.5mL×1 瓶, -20°C 保存;
- 试剂四：液体 25mL×1 瓶, -20°C 保存;
- 试剂五：液体 1mL×1 支, -20°C 保存;
- 试剂六：粉剂×1 支, -20°C 保存, 用时加入 2mL 蒸馏水;

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°C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°C 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min。

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、200 μ L 工作液和 15 μ L 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 $\Delta A=A1-A2$ 。

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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1808 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 365 \times \Delta A \div W$

(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/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.73 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 2.25 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : 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, 0.01 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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 3616 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 730 \times \Delta A \div W$

(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/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.46 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 2.25 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ 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。