Mitochondrial Respiratory Complex I Activity Assay Kit

线粒体复合体 I/NADH-辅酶 Q 还原酶试剂盒说明书

货号：BN72612 | 方法：微板法 | 规格：48 样

一、产品简介：

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。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 0.3mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 0.6mL×1 支	4℃保存	
试剂五	粉剂×2 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂六	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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℃×700g 离心 10min（若漂浮有脂肪，可用枪头去除）。

② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 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200μL试剂二和2μL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（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 340nm。

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 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	170
样本	10
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，△A=A1-A2。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活力(nmol/min /mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr) ÷T=643.1×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 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÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=130×ΔA÷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 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

复合体 I 活力(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.26×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；　　d---光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；　　V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积，2×10^{-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。