

线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Chain Complex I Activity Assay Kit

微量法

货号：AK205

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK205-提取液	75mL×2 瓶	4℃保存；
AK205-A	20mL×1 瓶	4℃保存；
AK205-B	粉剂×2 瓶	4℃保存；临用前加入 1mL 丙酮，4℃可保存一个月；
AK205-C	0.1ml×1 支	-20℃保存；临用前根据用量用丙酮进行 100 倍稀释后使用，现用现配；
AK205-D	粉剂× 2 瓶	-20℃保存；用时取一支加入 1.6mL 蒸馏水，充分溶解，-20℃可保存一个月；
工作液的配制： 临用前将 AK205-B 与 AK205-C 1:1 混合，现配现用。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：线粒体复合体 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。

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。

自备用品：

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 (UV 板)、研钵/匀浆器、丙酮、冰和蒸馏水。

样品测定的前处理：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g，4℃离心 10min。
3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 15min。
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 400uL 提取液，超声波破碎 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 5s，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。

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，蒸馏水调零。
2. 样本测定
 - (1) AK205-A 于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 15min。
 - (2) 在微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 中加入 10μL 样本、154μL AK205-A、20μL 工作液和 16μL AK205-D，立即混匀，记录第 10s 的吸光值 A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中准确反应 2 分钟，之后迅速取出比色皿并擦干，记录 2min 时的吸光度 A2，计算 ΔA=A1-A2。

复合体 I 活力单位的计算：

a.以微量石英比色皿计算：

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。

$$\text{复合体 I 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 1608 \times \Delta A \div Cpr$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-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；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$

2. 按样本鲜重计算（检测样本数为 100T/48S）

单位的定义：每 g 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 I 活性 1 (U/g 质量)} = [\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 1} \times V \text{ 样}) \div T = 1608 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{复合体 I 活性 2 (U/g 质量)} = [\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 2} \times V \text{ 样}) \div T = 643 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{复合体 I 总活性 (U/g 质量)} = 1608 \times \Delta A1 \div W + 643 \times \Delta A2 \div W$$

注： $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-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 提取 1：加入提取液体积，1mL；V 提取 2：沉淀重悬体积，0.4mL；T：反应时间，2min；W：样本重量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$

b.以 96 孔板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.5cm 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 (>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，在测定样本和提取液蛋白浓度均需要适当的稀释，由于提取液中含有一定的蛋白（约 1mg/mL），所以在计算样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白，但更建议对样本中的线粒体进行单独裂解并测定蛋白浓度。
3. 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活，且总检查规格变为 100T/48S。
4. 为延长试剂盒使用时间，所以 AK205-B 和 AK205-D 都多给一支。