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

紫外分光光度法

货号：AK204

规格：25T/24S、50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	25T/24S	50T/48S	储存条件
提取液 1	40mL×1 瓶	75mL×1 瓶	4℃保存；
提取液 2	6mL×1 瓶	12mL×1 瓶	-20℃保存；
AK204-A	25mL×1 瓶	50mL×1 瓶	4℃保存；
AK204-B	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃保存；临用前取一瓶加入 2 mL 丙酮，充分溶解，4℃可分装保存 1 个月；
AK204-C	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存；临用前加入 0.1ml 丙酮溶解后使用，丙酮易挥发，注意封口，-20℃可保存两个月；
AK204-D	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存；用时取一瓶加入 2.4mL 蒸馏水，现配现用，充分溶解，-20℃可保存 1 个月，避免反复冻融；
试剂 C 工作液：临用前根据用量将溶解后的 C:丙酮=10ul:1ml (约 20T) 混合备用，现用现配。 工作液的配制：根据用量将丙酮：试剂 B：试剂 C 工作液=250μL：250μL：500μL (约 10T) 混合备用，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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、细胞超声破碎仪、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 1，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g，4℃离心 10min，弃沉淀，留上清。
3. 将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 15min，得到上清液和沉淀。
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 3 中的沉淀即为线粒体，加入 200μL 提取液 1 和 200μL 提取液 2，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. 紫外分光光度计预热30min 以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

(1) AK204-A 于37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 预热 15min。

(2) 在 1mL 石英比色皿中加入 50μL 样本、770μL AK204-A、100μL 工作液和 80μL AK204-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 1 分钟, 之后迅速取出比色皿并擦干, 记录 1min10s 时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

复合体 I 活力单位的计算:

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。

复合体 I 活性 (U/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 3215.43 \times \Delta A \div Cpr$

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; T: 反应时间, 1min; 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 25T/12S 或 50T/24S)

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。

复合体 I 活性 1 (U/g 质量) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取 1}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div W$

复合体 I 活性 2 (U/g 质量) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取 2}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

复合体 I 总活性 (U/g 质量) = $3215.43 \times \Delta A1 \div W + 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

注: $\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{提取 1}}$: 加入提取液体积, 1mL; $V_{\text{提取 2}}$: 沉淀重悬体积, (0.2+0.2) 0.4mL; T: 反应时间, 1min; W: 样本重量, g; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$

3. 按细胞数量计算 (检测样本数为 25T/12S 或 50T/24S)

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 1 (U/ 10^6 细胞) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{提取 1}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div N$

复合体 I 活性 2 (U/ 10^6 细胞) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{提取 2}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div N$

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

注: $\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{提取 1}}$: 加入提取液体积, 1mL; $V_{\text{提取 2}}$: 沉淀重悬体积, (0.2+0.2) 0.4mL; T: 反应时间, 1min; N: 细胞数量, 以 10^6 计; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$

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 1 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 (约 0.5mg/ml), 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。