

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
提取液 1	75mL×2 瓶	4℃保存;
提取液 2	22mL×1 瓶	-20℃保存;
AK205-A	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK205-B	粉剂×2 瓶	4℃保存; 临用前取一瓶加入 1 mL 丙酮, 充分溶解, 4℃可分装保存 1 个月;
AK205-C	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;
AK205-D	粉剂× 2 瓶	-20℃保存; 用时取一瓶加入 1.6mL 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=5ul:0.5ml (约 50T) 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 50T) 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/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、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/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. 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 10 μ L 样本、154 μ L AK205-A、20 μ L 工作液和 16 μ L 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 $^{\circ}$ C (哺乳动物) 或 25 $^{\circ}$ C (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:

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。

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 反总: 反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol / cm; d: 微量石英比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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, 1mol=10 9 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。

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 反总: 反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol / cm; d: 微量石英比色皿光径, 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, (0.2+0.2) 0.4mL; T: 反应时间, 1min; W: 样本重量, g; 10 9 : 单位换算系数, 1mol=10 9 nmol

3. 按细胞数量计算 (检测样本数为 100T/48S)

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 反总: 反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol / cm; d: 微量石英比色皿光径, 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, (0.2+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, 1mol=10 9 nmol

b. 以 96 孔板 (UV 板) 计算:

将公式中的 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 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。
4. 为延长试剂盒使用时间, 所以 AK205-B 和 AK205-D 都多给一支。