

## 线粒体呼吸链复合体 I /NADH-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1100

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织和细胞

## 产品简介

线粒体呼吸链复合体 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物体内线粒体呼吸链复合体 I 活性，其原理是线粒体呼吸链复合体 I（简称复合体 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。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃保存
试剂二	10mL	20mL	4℃保存
试剂三	1mL	2mL	4℃避光保存
试剂四	12.5mL	25mL	-20℃避光保存
试剂五	0.5mL	1mL	-20℃避光保存
试剂六	1	1	-20℃避光保存

## 自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）及恒温箱

96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂六：临用前配制，48T 加入 1mL 去离子水充分溶解，96T 加入 2mL 去离子水充分溶解，未用完的已溶解的试剂六请分装后-20℃保存，避免反复冻融。

工作液的配制：将试剂五转移到试剂四中混合溶解；如果检测样本是哺乳动物来源，请置于 37℃ 孵育 5min；如果样本是其他物种，则置于 25℃，孵育 5min。

## 样本制备

## 产品说明书

**注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。**

线粒体呼吸链复合体 I 的提取：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4 $^{\circ}$ C，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
3. 再次离心上清，11,000g，10min，4 $^{\circ}$ C，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作；
4. (选做)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 (此步可选做，可用于判断线粒体提取效果)；
5. 在沉淀中加入 200 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ L 试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步线粒体呼吸链复合体 I 酶活性检测

### 实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 在 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿中依次加入 10 $\mu$ L 样本、15 $\mu$ L 试剂六和 200 $\mu$ L 工作液，轻敲板，充分混匀后，立即读取 340nm 处 0min 初始吸光值  $A_1$  和 2min 后的吸光值  $A_2$ ，计算  $\Delta A=A_1-A_2$ 。

**注意：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（高于 2.0）或  $\Delta A$  大于 0.4，可用试剂二稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。若  $\Delta A$  偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高检测数值。**

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25 $^{\circ}$ C（一般物种）或者 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）。
3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4 个样本）。

### 结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

上清中线粒体呼吸链复合体 I 活力的计算：

上清的复合体 I 活力(U/g 鲜重)=[ $\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  (W  $\div$  V<sub>提取</sub>  $\times$  V<sub>样</sub>)  $\div$  T=3654  $\times$   $\Delta A_1 \div$  W

沉淀中线粒体呼吸链复合体 I 活力的计算：

线粒体沉淀的复合体 I 活力(U/g 鲜重)=[ $\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  (W  $\div$  V<sub>重悬</sub>  $\times$  V<sub>样</sub>)  $\div$  T=731  $\times$   $\Delta A_2 \div$  W

样本中复合体 I 总活力的计算：

复合体 I 总活力即为上清中复合体 I 活力与沉淀中复合体 I 活力之和。

复合体 I 总活力(U/g 鲜重)=3654  $\times$   $\Delta A_1 \div$  W+731  $\times$   $\Delta A_2 \div$  W

2. 按细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

上清中线粒体呼吸链复合体 I 活力的计算：

上清的复合体 I 活力(U/10<sup>4</sup> cell)=[ $\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  (V<sub>样</sub>  $\div$  V<sub>提取</sub>  $\times$  500)  $\div$  T=7.31  $\times$   $\Delta A_1$

沉淀中线粒体呼吸链复合体 I 活力的计算：

线粒体沉淀的复合体 I 活力(U/10<sup>4</sup> cell)=[ $\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div$  (V<sub>样</sub>  $\div$  V<sub>重悬</sub>  $\times$  500)  $\div$  T=1.46  $\times$   $\Delta A_2$

样本中复合体 I 总活力的计算：

复合体 I 总活力即为上清中复合体 I 活力与沉淀中复合体 I 活力之和。

复合体 I 总活力(U/10<sup>4</sup> cell)=7.31  $\times$   $\Delta A_1$ +1.46  $\times$   $\Delta A_2$

V<sub>反应</sub>：反应体系总体积，2.25  $\times$  10<sup>-4</sup>L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数，6.22  $\times$  10<sup>3</sup>L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5cm；10<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol；V<sub>样</sub>：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min； $\Delta A_1$ ：上清测定值；W：样本重量，g；V<sub>提取</sub>：提取体系体积，1.01mL； $\Delta A_2$ ：沉淀测定值；V<sub>重悬</sub>：重悬沉淀体积，0.202mL；500：细胞总数，500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d:0.5cm 调整为 d:1cm 进行计算即可。

### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。

## 产品说明书

4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

- PMK1101 线粒体呼吸链复合体 II /琥珀酸-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1102 线粒体呼吸链复合体 III /CoQ-细胞色素 C 还原酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1103 线粒体呼吸链复合体 IV /细胞色素 C 氧化酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1104 线粒体呼吸链复合体 V /ATP 合酶/三磷酸腺苷合酶检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

