

线粒体复合体 I 试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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^{2-} ，是呼吸电子传递链上产生 O_2^{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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

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、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：25mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：5mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：0.5 mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：25mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂五：1 mL×1 支，-20℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存，用时加入 2mL 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

工作液的配制：临用前将试剂五转移到试剂四中混合溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- ① 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- 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 200uL 试剂二和 2uL 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），用于复合体 I 酶活性测定。

测定步骤：

1、 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）工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。

（2）在 1mL 石英比色皿中加入 40 μ L 样本、800 μ L 工作液和 60 μ L 试剂六，立即混匀，记录 340nm 处

初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 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。

$$\text{复合体 I 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1808 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{复合体 I 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 365 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

$$\text{复合体 I 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.73 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 9×10^{-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，0.04 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。