



线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex I Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex I Activity Assay Kit

一、产品描述

复合体 I 是呼吸链电子传递的起始复合体，是由 NADH 脱氢酶和一系列铁硫蛋白组成，且能够催化一对电子从 NADH 传递给泛醌 (CoQ)，又称 NADH 脱氢酶或 NADH-CoQ 还原酶，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。复合体 I 活性的测定对呼吸电子传递链 (ETC) 和活性氧 (ROS) 生成状态分析具有重要意义。

复合体 I 能够催化 NADH 脱氢生成 NAD⁺，NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过测定 NADH 的氧化速率即可表征复合体 I 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 75 mL×2 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 22 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C 保存	使用前每支加入 2 mL 丙酮充分溶解 (使用后密封保存，配制后 4°C 可保存 1 个月)
试剂三	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 100 μL 丙酮充分溶解 使用后密封保存，配制后 -20°C 可保存 2 个月 使用前使用丙酮稀释 100 倍即为试剂三应用液
试剂四	粉剂×2 瓶	-20°C 保存	使用前每支加入 2.4 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 -20°C 可保存 1 个月，避免反复冻融)
工作液的配制 (现用现配): 使用前根据样本量按丙酮: 试剂二: 试剂三应用液=1:1:2 的体积比配制，充分混匀即为工作液。			

需自备试剂: 丙酮 (C₃H₆O, MW = 58.08, CAS: 67-64-1)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、丙酮和蒸馏水。

1. 样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

- ① 称取约 0.1 g 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液 A，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，4°C 600 g 离心 10 min，取上清；将离心上清液移至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 15 min；
- ② 步骤①离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体 I（此步可选做）。
- ③ 步骤①离心后沉淀中分别加入 200 μL 提取液 A 和 200 μL 提取液 B，冰浴超声破碎（功率 20% 或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为待测样本，用于线粒体复合体 I 活性测定。

2. 测定步骤

① 紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

② 试验前将试剂一 37°C 预热 15 min。

③ 在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
待测样本	10
试剂一	154
工作液	20
试剂四	16

吸光值测定：① 立即充分混匀并开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1；
② 37°C 准确反应 120 s，测定 130 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③ 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3. 线粒体呼吸链复合体 I 活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

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

$$\text{复合体 I (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{3215.43 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

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

$$\text{复合体 I (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{1607.72 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

注释： $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入待测样本的体积，0.01 mL； $V_{\text{反总}}$ ：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_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①若 A1 大于 1.5 或 ΔA 大于 0.4, 将待测样本使用蒸馏水稀释后再进行测定, 计算时相应修改;
- ②提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白, 测定样本蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量;
- ③准确在规定时间点完成吸光值的测定, 以保证结果的准确性和重复性; 若使用 96 孔 UV 板测定, 应使用多道移液器且分批进行测定, 以确保组间反应时间一致;
- ④为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系;
- ⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活, 若使用样本质量计算, 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。

附：使用组织样本质量计算的公式

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

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

$$\text{上清中复合体 I (U/g)} = \frac{\Delta A_1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.43 \times \Delta A_1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 I (U/g)} = \frac{\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A_2}{W}$$

$$\text{复合体 I (U/g)} = \text{上清中复合体 I} + \text{沉淀中复合体 I} = \frac{3215.43 \times \Delta A_1}{W} + \frac{1286.17 \times \Delta A_2}{W}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

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

$$\text{上清中复合体 I (U/g)} = \frac{\Delta A_1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.72 \times \Delta A_1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 I (U/g)} = \frac{\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A_2}{W}$$

$$\text{复合体 I (U/g)} = \text{上清中复合体 I} + \text{沉淀中复合体 I} = \frac{1607.72 \times \Delta A_1}{W} + \frac{643.09 \times \Delta A_2}{W}$$

注释：V 反总：反应体系总体积, 2×10^{-4} L; V 样：反应体系中加入待测样本的体积, 0.01 mL; V 提：待测样本总体积, 1 mL; V 样总：沉淀重悬体积, 0.4 mL; ε : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d_1 : 96 孔 UV 板光径, 0.5 cm; d_2 : 微量石英比色皿光径, 1 cm; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 10^9 : 单位换算系数, 1 mol= 10^9 nmol; ΔA_1 : 上清测定值; ΔA_2 : 沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

