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.

Catalog Number **AKOP005M**
Storage Temperature **-20 ℃**
Size **100T/96S**

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℃保存	-
提取液 B	液体 22 mL×1 瓶	-20℃保存	-
提取液 C	液体 0.6 mL×3 支	-20℃保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	**使用前加入 4 mL 无水乙醇充分溶解**（使用后密封保存，配制后 4℃可保存 1 个月）
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存	**使用前每瓶加入 1.6 mL 蒸馏水充分溶解**（配制后-20℃可保存 1 个月，避免反复冻融）

需自备试剂：无水乙醇（C_2H_6O，MW=46.07，CAS: 64-17-5）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、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、无水乙醇和蒸馏水。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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 和 10 μL 提取液 C**，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，4℃ 600 g 离心 10 min，**取上清**；将离心上清液移至另一离心管中，4℃ 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、200 μL 提取液 B 和 4 μL 提取液 C**，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（可用于蛋白含量测定）。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm。

②试验前将**试剂一** 37℃预热 15 min。

③在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（μL）
待测样本	10
试剂一	155
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	15

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；②37℃准确反应 180 s，测定 190 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算ΔA=A1-A2。

3.线粒体呼吸链复合体 I 活性计算

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。

$$\text{复合体 I（U/mg prot）} = \frac{\Delta A \times V_{反总} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times V_{样} \times Cpr \times T} = \frac{2143.62 \times \Delta A}{Cpr}$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.01 mL；V 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：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；T：反应时间，3 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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

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。

$$\text{上清中复合体 I（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{2165.06 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 I（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{866.02 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 I（U/g）=上清中复合体 I+沉淀中复合体 I=} \frac{2165.06 \times \Delta A1}{W} + \frac{866.02 \times \Delta A2}{W}$$

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，1.01 mL；$V_{样总}$：沉淀重悬体积，0.404 mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；T：反应时间，3 min；W：样本质量，g；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol；ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值。

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