



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

线粒体呼吸链复合体I/NADH-辅酶Q还原酶试剂盒

紫外分光光度法

货号: R45012-24S/48S

产品简介:

复合体I(EC1.6.5.3) 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。

复合体I能够催化NADH 脱氢生成 NAD⁺, 在340nm 下测定NADH 的氧化速率进而得出该酶活性大小。

试剂盒组分与配制:

试剂名称	R45012-24S	保存要求	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体6mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体0.5mL×1支	4℃保存	
试剂四	液体1mL×1支	4℃保存	
试剂五	粉剂×2支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加0.6mL蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完
试剂六	液体22mL×1瓶	4℃保存	

试剂名称	R45012-48S	保存要求	备注
试剂一	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体0.5mL×1支	4℃保存	
试剂四	液体2mL×1支	4℃保存	
试剂五	粉剂×2支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加1.1mL蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完



试剂六	液体35mL×1瓶	4℃保存	
-----	-----------	------	--

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 石英比色皿(光径1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

线粒体复合体I 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备(提示:整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):

①称取约0.1g 组织或收集500万细菌/细胞,加入1mL 试剂一,用冰浴匀浆器或研钵匀浆,转移至离心管后于4℃×700g 离心10min。

②弃沉淀,上清液移至另一离心管中,4℃×12000g 离心10min。沉淀即为提取的线粒体,用作第④步操作。

③(选做)上步得到的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,用于判断线粒体提取效果。

④在沉淀(线粒体)中加入200μL试剂二和2μL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),液体置于冰上用于线粒体复合体I酶活性测定。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取,或按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min 以上,设定温度25℃,调节波长至340nm,蒸馏水调零。

②若待测上清液比较浑浊(蛋白浓度比较高),可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量(试剂六相应增加)进行预测定实验。



③将试剂四和五和六置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育15min;在1mL石英比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂四	40
试剂五	40
试剂六	680
样本	40
混匀, 立即于340nm处读取A1,置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种),10min后读取A2,ΔA=A1-A2。	

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体I 活力(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \\ = 321.5 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体I 活力(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 65 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每1万个细菌/细胞每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体I 活力(nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ = 0.13 \times \Delta A$$

ε---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d-- 光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 0.202 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

V2---反应体系总体积, 8×10^{-4} L;

T---反应时间, 10min;

W--- 样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 500万;

Cpr--- 蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的BCA 蛋白含量测定试剂盒。



源叶