

线粒体呼吸链复合体 I /NADH 辅酶 Q 还原酶活性检测试剂盒(微量法)

Mitochondrial complex I/NADH-CoQ reductase Activity Assay Kit



产品详情

产品货号	产品名称	储存条件	有效期
SK2930	线粒体呼吸链复合体 I/NADH 辅酶 Q 还原酶活性检测试剂盒(微量法)	-20℃	6 个月

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系萨默斯工作人员

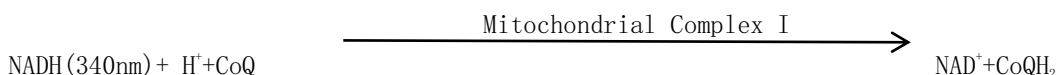
试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 75mL×2 瓶	2-8℃ 保存
提取液二	液体 22mL×1 瓶	-20℃ 保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃ 保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃ 保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取一支加入 1mL 丙酮，充分溶解，2-8℃ 可保存 1 个月(1 瓶粉剂即可做 100T，为延长试剂盒使用时间，故此产品多给一支)。
2. 试剂三：临用前加入 0.1mL 丙酮，丙酮易挥发，使用完毕后注意封口，-20℃ 可保存 2 个月。
3. 试剂三工作液：临用前根据用量将试剂三：丙酮=5 μL：0.5mL(约 50T)混合备用，现用现配。
4. 试剂四：临用前取一支加入 1.6mL 蒸馏水(约 100T)，充分溶解，-20℃ 可保存 1 个月，避免反复冻融(1 瓶粉剂即可做 100T，为延长试剂盒使用时间，故此产品多给一支)。
5. 工作液的配制：根据用量将丙酮：试剂二：试剂三工作液=250 μL：250 μL：500 μL(约 50T)混合备用，现配现用。

产品说明(仅供参考)：

1. 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。
2. 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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、细胞超声破碎仪、丙酮(>98%，AR)、冰和蒸馏水。

操作步骤(仅供参考)：

一、样本处理

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0mL 提取液一，用匀浆器或研钵于冰上快速匀浆(约 30 次)。
2. 4℃600g 离心 10min，弃沉淀，留上清。上清再次离心，4℃11000g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
3. 上一步结果得到的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，可以判断线粒体提取效果)。
4. 在沉淀中加入 200 μL 提取液一和 200 μL 提取液二，超声波破碎(功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 15 次)，用于复合体 I 酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 试剂一 37℃预热 15min。
3. 操作表：在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂一	154
工作液	20
试剂四	16

充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃水浴 1min(酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃)，拿出迅速擦干测定 1min10s 时的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、复合体 I 活力单位的计算

1. 以微量石英比色皿计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

复合体 I 活力 (U/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V 反应：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：微量石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

2. 以 96UV 孔板计算：

将上述公式中的 d=1cm 改为 d=0.6cm 进行计算即可。

注意事项：

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(A1 高于 1.5)，可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若 ΔA 大于 0.4，需将样本稀释适当倍数(计算公式中乘以相应稀释倍数)；若 ΔA 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
2. 样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液一中含有一定浓度的蛋白(约 1mg/mL)，所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量(约 0.5mg/mL)。
3. 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活。另附按样本计算公式和按细胞数量计算公式
4. 附：使用样本重量计算公式：(样本检测数为 100T/48S)

A、上清中复合体 I 活力的计算：

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。

复合体 I 活性 (U/g 质量) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div W$

B、沉淀中复合体 I 活力的计算：

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。

复合体 I 活性 (U/g 质量) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反应：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：微量石英比色皿光径，1cm；V 提取：加入提取液一体积，1mL；V 重悬：沉淀重悬体积(0.2mL 提取液一+0.2mL 提取液二)，0.4mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，1min；W：样本质量，g；

10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

C、样本复合体 I 总活力的计算:

样本复合体 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。

按样本质量计算: 复合体 I (U/g 质量)= $3215.43 \times \Delta A1 \div W + 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

D、以 96UV 孔板计算:

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算即可。

5. 附: 使用细胞数量计算公式: (样本检测数为 100T/48S)

A、上清中复合体 I 活力的计算:

单位的定义: 每 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活性 ($\text{U}/10^6\text{cell}$)= $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div N$

B、沉淀中复合体 I 活力的计算:

单位的定义: 每 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

复合体 I 活性 ($\text{U}/10^6\text{cell}$)= $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div W \Delta A1$:

上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; $V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}\text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$;

d : 微量石英比色皿光径, 1cm ; $V \text{ 提取}$: 加入提取液一体积, 1mL ; $V \text{ 重悬}$: 沉淀重悬体积 (0.2mL 提取液一 + 0.2mL 提取液二), 0.4mL ; $V \text{ 样}$: 加入样本体积, 0.01mL ; T : 反应时间, 1min ; N : 细胞数量, 以 10^6 计;

10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

C、样本复合体 I 总活力的计算: 样本复合体 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 总活性 ($\text{U}/10^6\text{cell}$)= $3215.43 \times \Delta A1 \div N + 1286.17 \times \Delta A2 \div N$

D、以 96UV 孔板计算: 将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算即可。

6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

8. 实验结果受多种因素影响, 相关处理仅限于产品本身, 不涉及其他赔偿。

SUMMUS
LIFE SCIENCES

免责声明: 本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

北京伊事达科技有限公司

电话: 13564444959

官网: www.followme-shop.com

地址: 北京市海淀区东北旺西路 58 号尚科办公社区 C 区一楼



公众号

客服