

## 线粒体复合体 I 试剂盒说明书

### 分光光度法 25 管/24 样

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  $O^{2-}$ , 是呼吸电子传递链上产生  $O^{2-}$  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  $\mu$ L 样本、800  $\mu$ L 工作液和 60  $\mu$ 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。

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。

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。

复合体 I 活力 (nmol/min/ $10^4$  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， $9 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1 cm；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。