

线粒体复合体I试剂盒说明书

微量法 100管/96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。

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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一: 液体100mL×1瓶, -20°C保存;

试剂二: 液体20mL×1瓶, -20°C保存;

试剂三: 液体1.5mL×1瓶, -20°C保存;

试剂四: 液体25mL×1瓶, -20°C保存;

试剂五: 液体1mL×1支, -20°C保存;

试剂六: 粉剂×1支, -20°C保存, 用时加入2mL蒸馏水; 用不完的试剂分装后-20°C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°C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:

- 准确称取0.1g组织或收集500万细胞, 加入1mL试剂一和10uL 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆600g, 4°C离心5min。
- 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C离心10min。
- 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)。
- 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. 分光光度计或酶标仪预热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°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 孵育5min。

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、200μL工作液和15μL试剂六, 混匀, 记录340nm处初始吸光值A₁和 2min后的吸光值A₂, 计算ΔA=A₁-A₂。

复合体I活力单位的计算

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(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。

$$\text{复合体I活力 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1808 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{复合体I活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 365 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体I活力 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.73 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2.25×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 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。

b.使用96孔板测定的计算公式如下：

(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。

$$\text{复合体I活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3616 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{复合体I活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 730 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体I活力 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.46 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2.25×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01 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。