

叶绿体复合体 I 检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：25mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：1 mL×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：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：临用前将试剂三转移到试剂二中混合溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

叶绿体的提取：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，很快研磨或捣碎，30 秒内完成，使之成为匀浆液。
- ② 将匀浆液于 200g（离心率），4℃ 离心 1min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，1500g，4℃ 离心 5min。
- ④ 弃上清液，于沉淀中加入 0.5mL 试剂一混匀配成叶绿体悬浮液。混匀后测定叶绿体酶活性。

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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）孵育 5min。
 - (2) 在 1mL 石英比色皿中加入 40μL 样本、800μL 工作液和 60μL 试剂四，立即混匀，记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

叶绿体复合体 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。

$$\begin{aligned}\text{复合体 I 活力 (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 1808 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{复合体 I 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 904 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

- (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。

$$\begin{aligned}\text{复合体 I 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.81 \times \Delta A\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 9×10^{-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，0.04 mL；

V 样总：加入提取液体积，0.5 mL；

T：反应时间，2 min；

W：样本质量，g；

500：细胞或细菌总数，500 万。