

线粒体呼吸链复合体 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：

试剂一：25mL×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°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 40 μL 样本、800 μL 工作液和 60 μL 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。

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

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 I 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 365 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

- (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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 I 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.73 \times \Delta A \end{aligned}$$

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, 0.202 mL;

T: 反应时间, 2 min;

W: 样本质量, g;

500: 细胞或细菌总数, 500 万。