

线粒体呼吸链复合体I/NADH-CoQ 还原酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0515

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一支加入 1 mL 丙酮，充分溶解，2-8°C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°C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=5μL：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°C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=250μL：250μL：500μL（约 50T）混合备用，现配现用。

产品说明：

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。

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：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0 mL 提取液一，用匀浆器或研钵于冰上快速匀浆（约 30 次）。
2. 4°C 600 g 离心 10min，弃沉淀，留上清。上清再次离心，4 °C 11000 g 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 200μL 提取液一和 200μL 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°C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°C水浴1min（酶标仪有控温功能可将温度调至37°C），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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

V 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 样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，1 min；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) = $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div W$

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) = $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 1286.17 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; $V \text{ 反总}$: 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 ; 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 (U/ 10^6 cell) = $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 3215.43 \times \Delta A1 \div N$

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 (U/ 10^6 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 (U/ 10^6 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。

相关发表文献:

[1] Li C, Wu B, Li Y, Chen J, Ye Z, Tian X, Wang J, Xu X, Pan S, Zheng Y, Cai X, Jiang L, Zhao M. Amino acid catabolism regulates hematopoietic stem cell proteostasis via a GCN2-eIF2 伪 axis. Cell Stem Cell. 2022 Jul 7;29(7):1119-1134.e7. doi: 10.1016/j.stem.2022.06.004. PMID: 35803229.

[2] Wang Z, Yang N, Hou Y, Li Y, Yin C, Yang E, Cao H, Hu G, Xue J, Yang J, Liao Z, Wang W, Sun D, Fan C, Zheng L. L-Arginine-Loaded Gold Nanocages Ameliorate Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Promoting Nitric Oxide Production and Maintaining Mitochondrial Function. Adv Sci (Weinh). 2023 Sep;10(26):e2302123. doi: 10.1002/advs.202302123. Epub 2023 Jul 14. PMID: 37449329; PMCID: PMC10502842.

[3] Xin J, Zhu B, Wang H, Zhang Y, Sun N, Cao X, Zheng L, Zhou Y, Fang J, Jing B, Pan K, Zeng Y, Zeng D, Li F, Xia Y, Xu P, Ni X. Prolonged fluoride exposure induces spatial-memory deficit and hippocampal dysfunction by inhibiting small heat shock protein 22 in mice. J Hazard Mater. 2023 Aug 15;456:131595. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131595. Epub 2023 May 7. PMID: 37224709.





[4] Zhang Y, Zhang Y, Lei Y, Wu J, Kang Y, Zheng S, Shao L. MDM2 upregulation induces mitophagy deficiency via

Mic60 ubiquitination in fetal microglial inflammation and consequently neuronal DNA damage caused by exposure to ZnO-NPs during pregnancy. *J Hazard Mater.* 2023 Sep 5;457:131750. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131750. Epub 2023 Jun 1. PMID: 37315416.

[5] Yang Y, Zhao Y, Zhang Y, Niu L, Li W, Lu W, Li J, Schäfer P, Meng Y, Shan W. A mitochondrial RNA processing protein mediates plant immunity to a broad spectrum of pathogens by modulating the mitochondrial oxidative burst. *Plant Cell.* 2022 May 24;34(6):2343-2363. doi: 10.1093/plcell/koac082. PMID: 35262740; PMCID: PMC9134091.

参考文献:

[1] Gadicherla A K, Stowe D F, Antholine W E, et al. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2012, 1817(3): 419-429.

[2] Eike L, Jakob M C, Julian D L, et al. Conformational changes in mitochondrial complex I from the thermophilic eukaryote *Chaetomium thermophilum* [J]. *Science Advances*, 2022, 8(47): 419-429.

[3] [1] Pollard AK, Craig EL, Chakrabarti L. Mitochondrial Complex I Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6).

相关系列产品:

- BC3230/BC3235 线粒体呼吸链复合体 II/琥珀酸-辅酶 Q 还原酶活性检测试剂盒
- BC3240/BC3245 线粒体呼吸链复合体 III/CoQ-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒
- BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体 IV/细胞色素 C 氧化酶活性检测试剂盒
- BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体 V/ATP 合酶活性检测试剂盒

