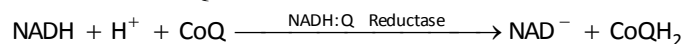


线粒体呼吸链复合物 I 活性检测试剂盒说明书

(A089-1-1 比色法 20 管/10 样)

一、技术背景

线粒体呼吸链复合物I, 通常称为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶Q还原酶 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme Q reductase; NADH-CoQ reductase), 又称为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase; NADH dehydrogenase), 是线粒体电子传递链中最大的结构成分: 含有30至40多个多肽结构。其特征性的酶活性是鱼藤酮敏感的NADH-辅酶Q还原酶 (NADH:Q Reductase)。复合物I催化线粒体内电子由供体NADH传递到内膜上辅酶Q受体 (泛醌; ubiquinone) 的能量转移反应, 为整个呼吸链反应系统的第一步。基于辅酶Q底物, 在鱼藤酮存在与否的情况下, 通过NADH-辅酶Q还原酶的催化, 转化成还原型泛醌 (CoQH₂), 同时还还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NADH) 转化为氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide; NAD), 在分光光度仪下产生吸收峰值的变化 (340nm 波长), 由此定量测定NADH-辅酶Q还原酶的特异性。其反应系统是:



二、产品内容

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液 (Reagent A)	20mL×1 瓶	-20℃
反应液 (Reagent B)	2.5mL×1 支	-20℃避光
阴性液 (Reagent C)	2mL×1 支	-20℃
底物液 (Reagent D)	500μL×1 支	-20℃避光
专性液 (Reagent E)	200μL×1 支	-20℃
产品说明书	1 份	-

注:试剂使用时避免反复冻融; 反应液 (Reagent B) 含有毒性物质, 避免直接用手接触; 试剂有效期 6 个月。

三、用户自备

比色皿: 用于比色分析的容器
 双波长分光光度仪: 用于比色分析
 恒温培养箱: 用于孵育反应物

四、实验步骤

(一)、测定准备

- 1、实验开始前, 将-20℃冰箱里的试剂盒中的试剂置冰槽里融化; 缓冲液 (Reagent A) 室温预热。
- 2、准备好待测样品 (例如纯化线粒体样品等), 置冰槽里;
- 3、设定好双波长分光光度仪 (温度为 30℃): 波长分别为 340nm 和 380nm, 间隔 30 秒, 读数 7 次 (共 3 分钟), 并置零。

(二)、活性测定: (注意: 样本 10 μg 总线粒体蛋白)

按顺序加入试剂	总活性管	非特异性管	背景对照管
缓冲液 (Reagent A) (μL)	780	760	780
反应液 (Reagent B) (μL)	100	100	100
底物液 (Reagent D) (μL)	20	20	20
混匀, 置 30℃培养箱里静置 3 分钟			
待测样品 (μL)	100	100	
阴性液 (Reagent C) (μL)			100
混匀, 即刻放进分光光度仪检测, 340nm 和 380nm 处分别读取各管吸光值 A1, 1 分钟或 3 分钟时再读取吸光值 A2. 计算 ΔA=【A1 (340nm) - A1 (380nm)】-【A2 (340nm) - A2 (380nm)】。			

(三)、计算:

①、样品活性 (总活性或非特异性)

$$\text{样品活性} (\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mgprot}) = \frac{(\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{背景}}) \times V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times 5.5 \times T} \div \text{Cpr}$$

V_样: 样品加入量, 0.1mL;

V_{反应}: 反应体系总体积, 1mL;

5.5: NADH 毫摩尔消光系数;

T: 反应时间, min;

Cpr: 样品蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

②、样品特异活性 = 样品总活性 - 样品非特异性

五、注意事项

- 1、本产品为 21 次 (10 个样本) 操作, 包括背景对照测定
- 2、操作时, 须戴手套
- 3、系统操作过程中, 背景测定只需 1 次
- 4、线粒体样品检测前, 须溶解; 建议冻存融解 (-70℃至 37℃) 循环 3 次
- 5、如果增强酶活检测, 建议使用线粒体复合物待测样品预处理试剂盒
- 6、加入样品启动反应后 3 秒内即刻比色读数
- 7、如果样本存在明显干扰, 可以选择进行样本背景对照测定, 即不加反应液 (Reagent B), 加入待测样品替代阴性液 (Reagent C)
- 8、通常反应 1 分钟后比色测定值趋于稳定; 测定值由高到低变化; 测定可以持续 3 分钟
- 9、测定值由高到低变化, 即 3 分钟测定读数低于 0 分钟测定读数, 表明有酶活性
- 10、比色测定后, 比色皿须清洗彻底
- 11、通常比色测定的 OD340 起始读数 0.5 为理想状态
- 12、如果用户没有双波长同步测定分光光度仪, 可以使用单波长 340nm 替代, 注意活性计算时, 毫摩尔吸光系数变成 6.2
- 13、建议待测样本线粒体蛋白浓度为 10μg/100μL; 如果样本酶活性过低或过高, 则可以增加或降低样本量; 注意计算公式的调整 (本公司提供线粒体溶解试剂盒为后续的线粒体蛋白浓度测定的预处理试剂盒和 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒)
- 14、如果使用细胞或组织裂解悬液, 则蛋白浓度为 50μg/100μL
- 15、样品特异活性是指鱼藤酮敏感的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-辅酶 Q 还原酶, 去除其它干扰因素 (例如复合物 II/III/IV 等)
- 16、如果用户需要研究线粒体呼吸链复合物 I 总活性包括鱼藤酮敏感和抗性之和, 请咨询技术顾问, 另购补充反应液 (Reagent B+)
- 17、线粒体呼吸链复合物 I (NADH-辅酶 Q 还原酶) 单位活性定义为: 在 30℃, pH 7.5 条件下, 每分钟内能够氧化 1 微摩尔还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 所需的酶量作为一个活性单位

六、质量标准

本产品经鉴定性能稳定

本产品经鉴定检测准确

七、主要用途

线粒体呼吸链复合物 I (NADH-辅酶 Q 还原酶) 活性比色法定量检测试剂是一种旨在使用合成辅酶 Q 同功类似物和特异性抑制剂, 通过反应系统测定样品中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 氧化后峰值的降低, 即采用比色法定测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适合于各种纯化线粒体样品 (动物、人体、酵母) 以及细胞或组织裂解悬液样品的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) - 辅酶 Q 还原酶的特异性活性检测。其用于衰老、能量代谢、蛋白组学、病理生理学、神经病变等研究。产品不含污染性蛋白酶, 严格无菌, 即到即用, 操作简捷, 性能稳定, 反应优化, 检测敏感。