

## 线粒体呼吸链复合物 I 活性测试盒

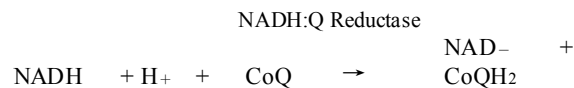
20 管/10 样

### 一、反应原理

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-CoQreductase), 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(CoQH<sub>2</sub>), 同时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 adeninedinucleotide; 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 还原酶的特异活性。其反应系统是:



### 二、试剂组成:

缓冲液 (Reagent A)	20 毫升
-----------------	-------

反应液 (Reagent B)	2.5 毫升
阴性液 (Reagent C)	2 毫升
底物液 (Reagent D)	500 微升
专性液 (Reagent E)	200 微升
产品说明书	1 份

### 三、保存方式:

-20℃冰箱保存, 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; 反应液 (Reagent B) 和底物液 (Reagent D), 避免光照, 有效保证 6 月

### 四、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

培养箱: 用于孵育反应物

### 五、实验步骤:

实验开始前, 将-20℃冰箱里的试剂盒中的试剂溶液置入冰槽里融化; 缓冲液 (Reagent A) 室温预热; 反应液 (Reagent B) 和底物液 (Reagent D) 注意避光。然后进行下列操作。

#### (一)、背景对照测定

- 1、移取 780 微升缓冲液 (Reagent A) 到新的比色皿
- 2、加入 100 微升反应液 (Reagent B)
- 3、加入 20 微升底物液 (Reagent D)

- 4、放进 30℃培养箱里静置 3 分钟
- 5、加入 100 微升阴性液 (Reagent C)
- 6、上下倾倒数次, 混匀 (限定在 3 秒之内)
- 7、即刻放进分光光度仪检测, 此为背景空对照: (340 波长读数-380 波长读数) 0 分钟 - (340 波长读数-380 波长读数) 1 分钟或 3 分钟

## (二)、样品总活性测定

- 1、移取 780 微升缓冲液 (Reagent A) 到新的比色皿
- 2、加入 100 微升反应液 (Reagent B)
- 3、加入 20 微升底物液 (Reagent D)
- 4、放进 30℃培养箱里静置 3 分钟
- 5、加入 100 微升待测样品 (注意: 10 微克总线粒体蛋白)
- 6、上下倾倒数次, 混匀 (限定在 3 秒之内)
- 7、即刻放进分光光度仪检测, 此为样品总活性读数: (340 波长读数-380 波长读数) 0 分钟 - (340 波长读数-380 波长读数) 1 分钟或 3 分钟

## (三)、样品非特异活性测定

- 1、移取 760 微升缓冲液 (Reagent A) 到新的比色皿
- 2、加入 100 微升反应液 (Reagent B)
- 3、加入 20 微升专性液 (Reagent E)
- 4、加入 20 微升底物液 (Reagent D)
- 5、放进 30℃培养箱里静置 3 分钟
- 6、加入 100 微升待测样品 (注意: 10 微克总线粒体蛋白)
- 7、上下倾倒数次, 混匀 (限定在 3 秒之内)
- 8、即刻放进分光光度仪检测, 此为样品非特异活性读数: (340 波长读数-380 波长读数) 0 分钟 - (340 波长读数-380 波长读数) 1 分钟或 3 分钟

## 六、样品活性计算

### (1)、样品活性（总活性或非特异活性）

$$\frac{(\text{样本读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量} (1\text{ml}) \times \text{样本稀释倍数}}{(0.1\text{ml}) \times 5.5 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times \text{反应时间} (1 \text{ 或者 } 3 \text{ 分钟})} \div \text{样本蛋白浓度} \times \text{样本容量}$$

单位： $\mu\text{mol NADH}/\text{min}/\text{mgprot}$

### (2)、样品特异活性

样品总活性 - 样品非特异活性 = 样品特异活性

（蛋白浓度可通过用总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定）