（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K834-M

产品规格：48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器：酶标仪(340 nm)

Elabscience®细胞线粒体呼吸链复合物 I(NADH-辅酶 Q 还原酶)比色法测试盒

Cell Mitochondrial Complex I (NADH-CoQ Reductase) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中的线粒体呼吸链复合物 I(NADH-辅酶 Q 还原酶)的活力。

检测原理

线粒体呼吸链复合物 I 催化 NADH 与底物反应，生成 NAD^+与还原型泛醌，检测 340 nm 处 NADH 吸光度下降速率可反应其活力。

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	15 mL×2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(340 nm)，恒温箱(37°C)

试剂：无水乙醇(AR)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂四底物液配制：

取一支试剂四用150 μL双蒸水溶解，混匀，-20°C可避光保存7天。

③ 试剂四工作液的配制：

取试剂四底物液：试剂三按1：100体积比混匀配制，2-8°C避光可保存12 h。

④ 试剂五工作液的配制：

取一瓶试剂五用4 mL无水乙醇溶解，振荡至溶液澄清，溶解后为淡黄色澄清液体，2-8°C避光可保存48 h，可分装-20°C避光保存7天。

⑤ 反应工作液配制：

取试剂五工作液：试剂四工作液按体积比=1：59混匀，现配现用，放在冰上避光待用，建议1 h内使用完。

样本准备

① 样本处理

细胞样本：收集1×10^6细胞样本加入200 μL试剂一，4 μL试剂二，振荡混匀，超声破碎(冰浴，功率200 W，超声5 s，间隔10 s，重复15次)，10000 × g低温离心3 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：2.85-119.04 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
Jurkat 细胞	不稀释	CHO 细胞	不稀释
HL-60 细胞	不稀释	Hela 细胞	不稀释
293T 细胞	不稀释	Molt-4 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 试剂准备时，需确保配制后的试剂五工作液完全溶解，可延长振荡溶解的时间或超声一段时间。

② 样本测定时，若 3 min OD 值下降超过 0.3，则需要对样本进行稀释。

③ 建议使用新鲜样本进行测定。

④ 一次性检测不超过 8 个样本。

操作步骤

① 测定孔：取 20 μL 待测样本加入测定孔中。

② 各测定孔中加入 200 μL 反应工作液。

③ 酶标仪于 340 nm 处测定 OD 值 A_1，5 min 后测定 OD 值 A_2。$\Delta A = A_1 - A_2$。

注：加入工作液后，可每分钟记录一次 OD 值，共记录 5 min，观察其 5 min 内的 OD 值变化是否为匀速下降。

操作表

	测定孔
样本(μL)	20
反应工作液(μL)	200
酶标仪于 340 nm 处测定 OD 值 A_1，5 min 后测定 OD 值 A_2。$\Delta A = A_1 - A_2$。	

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

细胞样本中线粒体复合物 I 酶活的计算公式：

定义：37°C 条件下，每克细胞线粒体蛋白每分钟催化分解 1 μmol NADH 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{线粒体复合物 I 酶活 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{测定}}{6600 \times 0.7} \times V_1 \div T \div V_2 \div C_{pr} \times f \times 10^6$$

注解：

$\Delta A_{测定}$：测定孔变化 OD 值（$A_1 - A_2$）

6600：NADH 摩尔消光系数，L/(mol•cm)

0.7：酶标板孔的光径，cm

V_1：总反应体积，0.22 mL

V_2：加样体积，0.02 mL

T：反应时间，5 min

f：样本稀释倍数

C_{pr}：样本蛋白浓度，gprot/L

10^6：1 mol = 10^6 μmol

附录 1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	2.85-119.04 U/L	**批间差**	5.0-8.0 %
灵敏度	2.85 U/L	**批内差**	3.0-4.0 %
回收率	95-105 %		

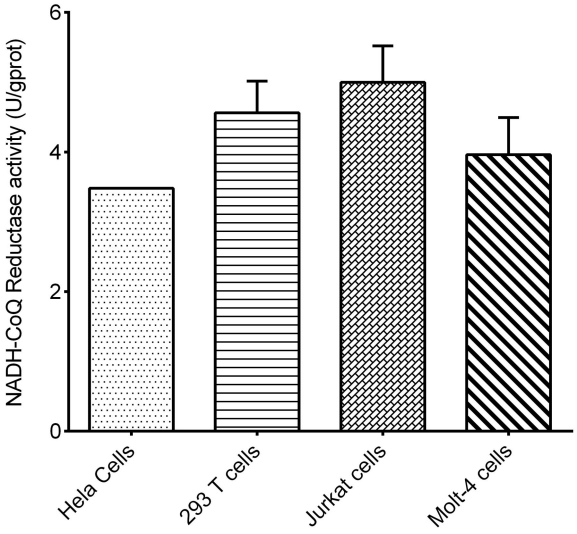
附录2 实例分析

例如检测HeLa细胞(数据仅供参考)：

取HeLa细胞样本20 μL，按操作表操作，结果如下：测定孔初始OD值A_1为0.672，反应5 min后OD值A_2为0.66，$\Delta A_{测定} = A_1 - A_2 = 0.672 - 0.66 = 0.012$。样本蛋白浓度为1.64 gprot/L，计算结果为：

$$\underset{(U/gprot)}{线粒体复合物I总酶活} = \frac{0.012}{6600 \times 0.7} \times 0.22 \div 5 \div 0.02 \div 1.64 \times 10^6 = 3.48\ U/gprot$$

按说明书操作，测定Hela细胞样本（1×10^6个，蛋白浓度1.64 gprot/L，加样量20 μL)、293T细胞 (1×10^6个，蛋白浓度为1.04 gprot/L，加样量20 μL)、Jurkat细胞(1×10^6个，蛋白浓度为1.02 gprot/L，加样量20 μL)、Molt-4细胞(1×10^6个，蛋白浓度为0.63 gprot/L，加样量20 μL)中线粒体复合物I活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本浓度低或者稀释倍数较大	增加上样量或重新匀浆提高匀浆浓度
	样本匀浆液放置时间过长	重新处理样本
	样本酶活太低	选取当天新取的样本

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。