（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-K149-M

产品规格：48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器：酶标仪(340 nm)

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

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动物组织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 与泛醌底物反应，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。

本试剂盒检测组织样本时，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 A (Extraction Solution A)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor)	0.4 mL×1 支	0.4 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	15 mL×2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	抑制剂 (Inhibitor)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	阴性液 (Negative Reagent)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-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 试剂五底物液的配制：

取一支试剂五用150 μL双蒸水溶解，混匀，-20°C可避光保存7天。

③ 试剂五工作液的配制：

取试剂五底物液：试剂四按12: 1000体积比混匀配制， 2-8°C避光可保存12 h。

④ 试剂六工作液的配制：

取一瓶试剂六用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避光保存48 h，分装可-20°C避光保存7天。

⑤ 反应工作液配制：

取试剂六工作液：试剂五工作液按体积比=1：59混匀，现配现用，需要放在冰上避光待用，建议1 h内使用完。

样本准备

① 样本处理

组织样本：取0.1 g 组织样本加入0.9 mL试剂一 ，0.01 mL试剂三后匀浆，600 × g 低温离心5 min，弃沉淀取上清。上清液15000 × g低温离心10 min，弃上清取沉淀。沉淀加入200 μL试剂二与2 μL试剂三混匀，超声1 min。15000 × g低温离心10 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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：4.33-224.2 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
10%大鼠肌肉组织	1-2	10%大鼠肺组织	4-8
10%小鼠肝组织	1-2	10%小鼠心组织	4-8
10%大鼠心组织	1-2	10%小鼠肝组织	1-2
10%大鼠肾组织	2-4	10%猪心组织	1-2

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

① 试剂准备时，需确保配制后的试剂六工作液完全溶解，可延长振荡溶解的时间，将试剂倒入透明 EP 管检查试剂是否完全溶解至澄清透明。

② 样本测定时，3 min OD 值下降超过 0.3，则需要对样本进行稀释，保证样本测定处于反应匀速区间内，如有必要可每分钟测定一次 OD 值，观察其动力学变化。

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 对照孔：取 20 μL 样本加入各对照孔中，

测定孔：取 20 μL 样本加入各测定孔中。

② 对照孔加入 20 μL 试剂八，

测定孔加入 20 μL 试剂七。

③ 混匀，37°C 下孵育 3 min。

④ 对照孔与测定孔中加入 200 μL 反应工作液，

⑤ 酶标仪于 340 nm 处测定对照孔的 OD 值 $A_{对1}$、测定孔的 OD 值 $A_{测1}$，3 min 后，测定对照孔的 OD 值 $A_{对2}$、测定孔的 OD 值 $A_{测2}$。

注：对照孔测定总酶活，测定孔测定非特异性酶活；加入工作液后，可每分钟记录一次 OD 值，共记录 3 min，观察其 3 min 内的 OD 值变化是否为匀速下降。

操作表

	对照孔	**测定孔**
样本(μL)	20	20
试剂八(μL)	20	--
试剂七(μL)	--	20
混匀，37°C 下孵育 3 min		
反应工作液(μL)	200	200
酶标仪于 340 nm 处测定对照孔的 OD 值 $A_{对1}$、测定孔的 OD 值 $A_{测1}$，3 min 后，测定对照孔的 OD 值 $A_{对2}$、测定孔的 OD 值 $A_{测2}$。		

本试剂盒检测组织样本时，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

组织样本中线粒体复合物 I 酶活的计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织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。

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

注解：

$\Delta A_{测}$：测定孔变化 OD 值（$A_{测1}$- $A_{测2}$）

$\Delta A_{对}$：对照孔变化 OD 值（$A_{对1}$- $A_{对2}$）

6600：NADH 摩尔消光系数，L/(mol•cm)

0.7：光径，cm

V_1：总反应体积，0.24 mL

V_2：加样体积，0.02 mL

T：反应时间，3 min

f：样本稀释倍数

C_{pr}：样本线粒体蛋白浓度，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	4.33-224.2 U/L	**平均批间差**	8.4 %
灵敏度	4.33 U/L	**平均批内差**	0.8 %
平均回收率	102 %		

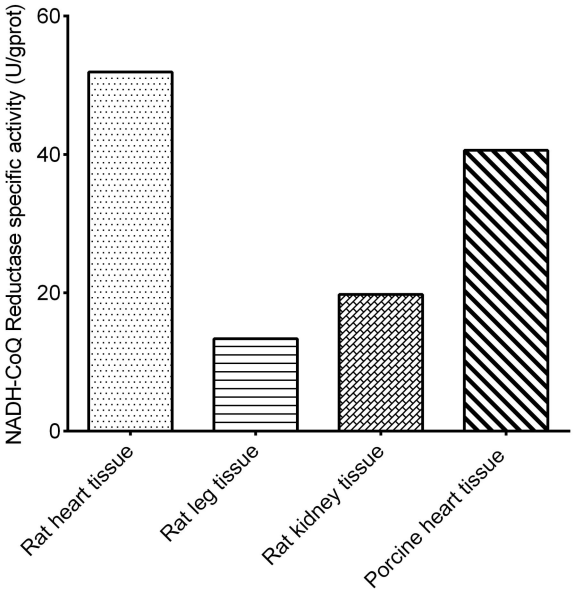
附录2 实例分析

例如检测20%大鼠心组织(数据仅供参考)：

制备的20%大鼠心组织线粒体上清液用试剂二稀释2倍，取稀释后的样本20 μL，按操作表操作，结果如下：对照孔初始OD值$A_{对1}$为0.597，反应3 min后OD值$A_{对2}$为0.433，$\Delta A_{对} = A_{对1} - A_{对2} = 0.597 - 0.433 = 0.164$。测定孔初始OD值$A_{测1}$为0.722，反应3 min后OD值$A_{测2}$为0.711，$\Delta A_{测} = A_{测1} - A_{测2} = 0.722 - 0.711 = 0.011$。20%大鼠心组织匀浆线粒体蛋白浓度为3.75 gprot/L，计算结果为：

$$\underset{(U/gprot)}{线粒体复合物I酶活} = \frac{(0.164 - 0.011)}{6600 \times 0.7} \times 0.24 \div 3 \div 0.02 \div 3.75 \times 2 \times 10^6 = 70.65\ U/gprot$$

按说明书操作，测定大鼠心组织线粒体上清液（20%线粒体匀浆蛋白浓度3.75 gprot/L，稀释2倍，加样量20 μL)、大鼠腿组织线粒体上清液(20%线粒体匀浆蛋白浓度为2.04 gprot/L，稀释2倍，加样量20 μL)、大鼠肾组织线粒体上清液(20%线粒体匀浆蛋白浓度为7.88 gprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、猪心组织线粒体上清液(20%线粒体匀浆蛋白浓度为1.54 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	选取当天新取的动物组织样本

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。

附录4 客户发表文献

1. Li Y, Liu Z, Wang P, et al. Bioengineered Extracellular Vesicles Delivering siMDM2 Sensitize Oxaliplatin Therapy Efficacy in Colorectal Cancer[J]. Advanced Healthcare Materials, 2403531.

2. Tian Y , Hong X , Xie Y ,et al.17 β -Estradiol (E 2) Upregulates the ER α /SIRT1/PGC-1 α Signaling Pathway and Protects Mitochondrial Function to Prevent Bilateral Oophorectomy (OVX)-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)[J].Antioxidants, 2023, 12(12).DOI:10.3390/antiox12122100.

3. Zhang Y , Luo C , Huang P ,et al.Luteolin alleviates muscle atrophy, mitochondrial dysfunction and abnormal FNDC5 expression in high fat diet-induced obese rats and palmitic acid-treated C2C12 myotubes[J].The Journal of Nutritional Biochemistry, 2025, 135.DOI:10.1016/j.jnutbio.2024.109780.

4. Xiao P , Wu S , Wang Z ,et al.Biotoxicity of paraquat to lung cells mediated by endoplasmic reticulum-mitochondria interaction[J].Journal of Molecular Histology, 2024, 55(6):1063-1077.DOI:10.1007/s10735-024-10249-7.

5. Chen L , Chen S , Bai Y ,et al.Electroacupuncture improves cognitive impairment after ischemic stroke based on regulation of mitochondrial dynamics through SIRT1/ PGC-1 α pathway[J].Brain research, 2024:1844.DOI:10.1016/j.brainres.2024.149139.