



NADH 氧化酶检测试剂盒

NOX Assay Kit

微量法

产品编号: AK377M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK377-A	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK377-B	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK377-C	1.5mL×1 支	-20℃保存;
AK377-D	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK377-E	3 mL×1 瓶	4℃保存;
AK377-F	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前每瓶加入 4.5mL 蒸馏水; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: NADH 氧化酶 (NADH oxidase, NOX) (EC 1.6.99.3) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 可在氧气存在下, 直接将 NADH 氧化为 NAD。该酶不仅参与 NAD 的再生, 而且与免疫反应密切相关。

原理: NOX 能够将 NADH 氧化为 NAD, NADH 的氧化与 2,6 二氯酚靛蓝 (DCPIP) 的还原相偶联, 蓝色的 DCPIP 被还原为无色的 DCPIP, 在 600nm 下测定蓝色 DCPIP 的还原速率计算出 NADH 氧化酶活性的大小。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

- ① 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL AK377-A 和 10uL AK377-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。
- ③ 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
- ④ 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的 NOX (此步可选做)。
- ⑤ 步骤④中的沉淀即为线粒体, 加入 200uL AK377-B 和 2uL AK377-C, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于 NOX 活性测定, 并用于蛋白浓度测定。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定
 - (1) AK377-D 于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min。
 - (2) 操作表:

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
AK377-D	175
AK377-E	25
AK377-F	40

混匀，记录 600nm 处 20s 时吸光值 A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃水浴中，准确反应 1 分钟，迅速取出比色皿并擦干，记录 1min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

NOX 活力单位的计算：

a 用微量玻璃比色皿测定的计算

按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

V 反总：反应体系总体积，0.25mL；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

b 用微量玻璃比色皿测定的计算

按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.005 \div T = 5000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

V 反总：反应体系总体积，0.25mL；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

注意事项：

1. 粗酶液的提取必须在 0℃-4℃中操作完成，以防止酶变性失活。
2. 比色皿中反应液的温度最好保持 37℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
4. 实验时，AK377-F 样本在冰上放置，以免变性和失活。
5. 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。

使用样本鲜重计算公式：

a 用微量玻璃比色皿测定的计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX 上清 (U/g 质量)} = \Delta A1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2525 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/g 质量)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 505 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{NOX (U/g 质量)} = \text{NOX 上清} + \text{NOX 沉淀} = 2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应总体积，0.25mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 提取：加入提取液体积，1.01mL；V 样总：沉淀重悬体积，0.202mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1min。

b 用 96 孔板测定的计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟 A600 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX 上清 (U/g 质量)} = \Delta A1 \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 5050 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/g 质量)} = \Delta A2 \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1010 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{NOX (U/g 质量)} = \text{NOX 上清} + \text{NOX 沉淀} = 5050 \times \Delta A1 \div W + 1010 \times \Delta A2 \div W$$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应总体积，0.25mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 提取：加入提取液体积，1.01mL；V 样总：沉淀重悬体积，0.202mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1min。