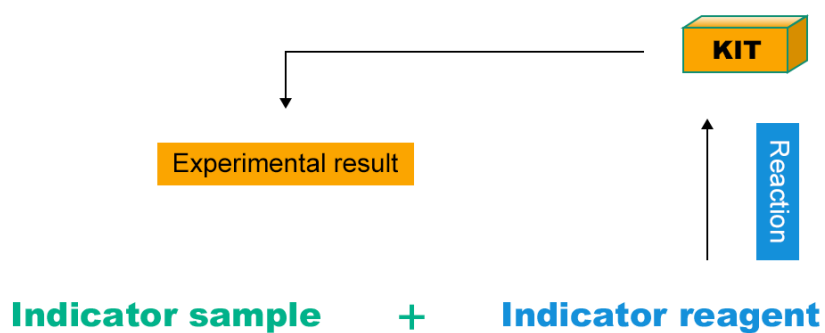


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0580

Size: 50T/48S

NADH 氧化酶 (NOX) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体 10mL × 1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 1mL × 1 瓶	-20℃ 保存	
试剂四	液体 50mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 6 mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	粉剂 × 2 瓶	-20℃ 保存	临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水, 用不完的试剂仍-20℃ 保存。

五、操作步骤:

● 样品测定的准备:

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 试剂一和 10uL 试剂三, 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, 11100g, 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 试剂二和 2uL 试剂三, 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。

● 测定操作:

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) 试剂四、试剂五和试剂六于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min。

(2) 在 1mL 石英比色皿中加入 40 μL 样本、700 μL 试剂四、100 μL 试剂五和 160 μL 试剂六, 混匀, 记录 600nm 处 20s 时吸光值 A1 和 1min 20s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

六、NOX 活力单位的计算:

1. 血清(浆)NOX 活力的计算

单位的定义: 每 mL 血清(浆)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。

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

2. 组织、细菌或细胞中 NOX 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

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

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算：

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

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

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$NOX (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 1.01 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1mL； V 样：加入样本体积，0.04mL； V 样总：加入提取液体积，0.202 mL； T：反应时间，1 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量； 500：细胞或细菌总数，500 万。