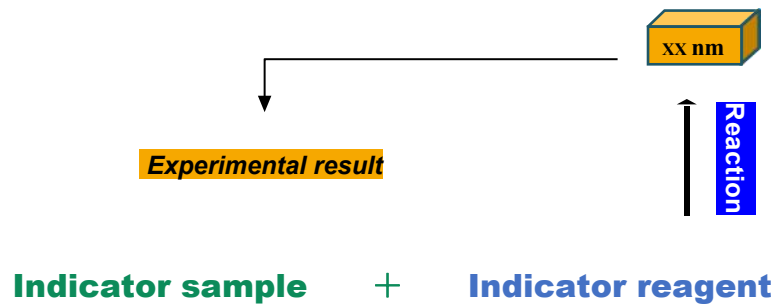


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

NADH 氧化酶 (NADH oxidase, NOX) 试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

测定原理：

NOX能够将NADH氧化为NAD，NADH的氧化 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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰、蒸馏水

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂三	液体 1.5mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 5mL 蒸馏水，现配现用。

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。

血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 试剂四于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育5min。

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10 μL样本、200 μL试剂四和40 μL试剂五，混匀，记录600nm处20s时吸光值A1和1min20s 后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

NOX 活力单位的计算

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.25mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，0.202mL；T：反应时间，1min；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。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下：

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0.005定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 5000 \times \Delta A$$

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。

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

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0.005定义为一个酶活力单位。

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

(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0.005定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 2.02 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.25mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；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。