

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 (NOX) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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 25mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 0.5mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂四	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂五	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂六	粉剂×2 瓶	-20℃保存	临用前每瓶加入 9mL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存

产品说明：

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。

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。

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

操作步骤：

一、样品测定的准备：

- 1、组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：
- 2、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。
- 3、将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- 4、将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- 5、将上清液转移至另一 EP 管中，用于线粒体中泄露 NOX 活性测定。
- 6、沉淀即为线粒体，加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三，用于 NOX 活性测定。
- 7、NOX 总酶活即为上清中 NOX 活性与沉淀中 NOX 活性之和。

二、测定步骤和加样表：

- 1、可见分光光度计预热 30min 以上；
- 2、试剂四 37°C保温放置。

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂四	700	700
试剂五	100	100
样本	40	40
蒸馏水		160
试剂六	160	-

将上述试剂按顺序在 1mL 玻璃比色皿中操作，加入试剂六后立即混匀，同时开始计时，在 600nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C 水浴中，准确反应 1 分钟。迅速取出比色皿并擦干，记录 1 分 20 秒时的吸光度 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，记录 A 测定、A 对照， $\Delta A1 = \Delta A$ 上清测定 - ΔA 上清对照， $\Delta A2 = \Delta A$ 沉淀测定 - ΔA 沉淀对照。

三、NOX 活力单位的计算：

A、上清中 NOX 活力的计算：

1、组织中 NOX 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 蛋白在反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。
 $NOX (U/mg \text{ prot}) = \Delta A1 \div 0.01 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \text{ 上清} \times V \text{ 样本}) = 2500 \times \Delta A1 \div Cpr \text{ 上清}$

(2) 按样本鲜重计算：

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。
 $NOX (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A1 \div 0.01 \times V \text{ 反总} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) = 2525 \times \Delta A1 \div W$

2、细菌或培养细胞中 NOX 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 蛋白在反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。
 $NOX (U/mg \text{ prot}) = \Delta A1 \div 0.01 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \text{ 上清} \times V \text{ 样本}) = 2500 \times \Delta A1 \div Cpr \text{ 上清}$

(2) 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。
 $NOX (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A1 \div 0.01 \times V \text{ 反总} \div (500 \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) = 5.05 \times \Delta A1$

V 反总：反应总体积，1mL；V 样本：加入样本体积，0.04mL；V 提取：加入提取液体积，1.01mL；Cpr 上清：上清中蛋白浓度，mg/mL；W，样本鲜重，g；500，细菌或细胞总数，500 万。

B、沉淀中 NOX 活力的计算：

1、组织中 NOX 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 蛋白在反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。
 $NOX (U/mg \text{ prot}) = \Delta A2 \div 0.01 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \text{ 沉淀} \times V \text{ 样本}) = 2500 \times \Delta A2 \div Cpr \text{ 沉淀}$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

$$\text{NOX (U/g 鲜重)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = 505 \times \Delta A2 \div W$$

2、细菌或培养细胞中 NOX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr 沉淀} \times V_{\text{样本}}) = 2500 \times \Delta A2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 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。

$$\text{NOX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = 1.01 \times \Delta A2$$

V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样本: 加入样本体积, 0.04mL; V 样总: 沉淀重悬体积, 0.202mL;
Cpr 沉淀: 沉淀重悬后蛋白浓度, mg/mL; W, 样本鲜重, g; 500, 细菌或细胞总数, 500 万。

C、样本 NOX 总活力的计算:

样本 NOX 总活力即为上清中 NOX 活力与沉淀中 NOX 活力之和。

1、组织中 NOX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{NOX (U/mg prot)} = 2500 \times \Delta A1 \div \text{Cpr 上清} + 2500 \times \Delta A2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

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

2、细菌或培养细胞中 NOX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{NOX (U/mg prot)} = 2500 \times \Delta A1 \div \text{Cpr 上清} + 2500 \times \Delta A2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 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。

$$\text{NOX (U/10}^4 \text{ cell)} = 5.05 \times \Delta A1 + 1.01 \times \Delta A2$$

注意事项:

- 1、粗酶液的提取必须在 0°C- 4°C 中操做完成, 以防止酶变性失活。
- 2、比色皿中反应液的温度最好保持 37°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 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, 试剂六样本在冰上放置, 以免变性和失活。