



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

NADH氧化酶活性检测试剂盒（微量法）

货号: R42016

规格: 100T/96S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	100mL×1瓶	4℃保存;
试剂-B	20mL×1瓶	4℃保存;
试剂-C	1.5mL×1支	-20℃保存;
试剂-D	20mL×1瓶	4℃保存;
试剂-E	3 mL×1瓶	4℃保存;
试剂-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-A 和 10uL 试剂-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 试剂-B 和 2uL 试剂-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) 试剂-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
试剂-D	175
试剂-E	25
试剂-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。

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



※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit

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。

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit 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°C- 4°C 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°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-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。

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

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

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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

$\Delta A1$: 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 A_{600} 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。