上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

NADPH氧化酶（NAO）试剂盒

可见分光光度法

货号：R43835-24S

产品简介：

NADPH 氧化酶 (NAO)是一个典型的膜蛋白，催化NADPH 氧化生成NADP, 并 将电子传递给氧原子从而产生超氧阴离子。广泛存在于动物、植物和真菌中。该酶异常可导致人慢性肉芽肿病 (GCD), 在植物中，该酶与其抗病性和各种胁迫有密切关系。

NADPH 氧化酶(NAO)将NADPH 氧化为NADP+的同时生成超氧阴离子(O2:-), 接 着与显色剂反应生成水溶性的黄色物质。对照通过添加该酶的特异性抑制剂 DPI 排除背景值。最终检测生成的有色物质在450nm 处的吸光值，即可计算得出 NAO 酶活性大小。

试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存条件	物
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体0.25mL×1支	-20℃保存	若凝固可放置室温或25℃水浴溶解。
试剂二	液体1.5mL×1支	-20℃保存	
试剂三	粉体mg×2支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加0.8mL蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	液体1.5mL×1支	-20℃保存	

所需的仪器和用品：

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

NADPH 氧化酶 (NAO)活性测定：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

①组织样本：

取约0.1g 组织，加入1mL 提取液，在4℃或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。 4℃×12000rpm 离心10min, 取上清作为待测液。

【注】:若增加样本量，可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取

②细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约500万细菌或细胞加入1mL

提取液，超声波破碎细菌或细胞(冰浴，功率200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次); 12000rpm 4℃离心10min, 取上清，置冰上待测。

【注】:若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

③液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

①可见分光光度计预热30min 以上，设定温度37℃,调节波长至450nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃)。

③在1mL玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	40	40
提取液	580	570
试剂一		10
37℃孵育5min(可能会产生沉淀，但不影响后续测定)		
试剂二	30	30
试剂三	30	30

试剂四	30	30
37℃避光孵育20min,于450nm读取吸光值A,△A=A测定-A对照。		

【注】若△A的值在零附近，可以延长反应时间T(如至40min或更长),则改变后的反应时间T 需代入公式重新计算。

结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使450nm 处吸光值变化0.005为一酶活单位。

NAO(△OD_{450}/min/mg prot)=ΔA÷(V1×Cpr)÷0.005÷T=250×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使450nm 处吸光值变化0.005为一酶活单位。

NAO(△OD_{450}/min/g 鲜重)=ΔA÷(W×V1÷V)÷0.005÷T=250×ΔA÷W

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每1万个细菌或细胞每分钟在反应体系中使450nm 处吸光值变化0.005为一酶活单位。

NAO(△OD_{450}/min/10^4cell)=ΔA÷(500×V1÷V)÷0.005÷T=5×ΔA

V--- 加入提取液体积，1mL;

V1--- 加入样本体积，0.04mL;

T---反应时间，20min;

W-- 样本质量，g;

500---细胞或细菌总数，万；

Cpr--- 样本蛋白质浓度，mg/mL; 建议使用本公司的BCA 蛋白含量检测试剂盒。