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

NADH氧化酶活性检测试剂盒（分光光度法）

货号： R42017

规格： 50T/48S

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	50mL×1瓶	4℃保存；
试剂-B	10mL×1瓶	4℃保存；
试剂-C	1mL×1支	-20℃保存；
试剂-D	35mL×1瓶	4℃保存；
试剂-E	5 mL×1瓶	4℃保存；
试剂-F	粉剂×2瓶	-20℃保存；临用前每瓶加入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、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、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	40
试剂-D	700
试剂-E	100
试剂-F	160
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 ΔA=A1-A2。	

NOX 活力单位的计算：

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。

NOX (U/mg prot) = ΔA×V 反总÷(V 样×Cpr)÷0.01÷T = 2500×ΔA÷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，1mL；V 样：加入样本体积，0.04mL；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℃- 4℃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℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃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：

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 上清（U/g 质量）=ΔA1÷0.01×V 反总÷(W÷V 提取×V 样)÷T=2525×ΔA1÷W

NOX 沉淀（U/g 质量）=ΔA2÷0.01×V 反总÷(W÷V 样总×V 样)÷T=505×ΔA2÷W

NOX（U/g 质量）= NOX 上清+ NOX 沉淀=2525×ΔA1÷W +505×ΔA2÷W

ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值；V 反总：反应总体积，1mL；V 样：加入样本体积，0.04mL；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。