

## NADH 氧化酶 (NOX) 试剂盒说明书

(货号: PB1023F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

### 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

### 试剂的组成和配制:

试剂一: 液体 50mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂二: 液体 10mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂三: 液体 1mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂四: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂五: 液体 6 mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂六: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存; 临用前每瓶加入 5mL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃ 保存。

### 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 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 沉淀即为线粒体, 加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三, 超声波破碎 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于 NOX 活性测定。

### 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂四	700
试剂五	100
样本	40
蒸馏水	
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min	
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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 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  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

### NOX 活力单位的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 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。

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

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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，1000 $\mu$ L； V 样：加入样本体积，40 $\mu$ L； 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：样品质量； 500：细胞或细菌总数，500 万。