NADH 氧化酶(NOX)试剂盒说明书

（货号：PB1023W96 微量法 96 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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100ml×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 20ml×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 1.5×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 24ml×1 瓶，4℃保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 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：

1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，蒸馏水调零。

2、 样本测定

（1）试剂四于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。

（2）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、200μL 试剂四和 40μL 试剂五，混匀，记录 600nm 处 20s 时吸光值 A1 和 1min20s 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A1-A2。

NOX 活力单位的计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（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。

NOX（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（Cpr×V 样）÷0.01÷T=2500×ΔA÷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。
NOX（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)÷0.01÷T=505×ΔA÷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。
NOX（U/10^4 cell）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×500)÷0.01÷T=1.01×ΔA
V 反总：反应体系总体积，250μL； V 样：加入样本体积，10μL；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。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下：

（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。
NOX（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（Cpr×V 样）÷0.01÷T=2500×ΔA÷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。
NOX（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)÷0.01÷T=505×ΔA÷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。
NOX（U/10^4 cell）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×500)÷0.01÷T=1.01×ΔA
V 反总：反应体系总体积，250μL； V 样：加入样本体积，10μL；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。