

NADH 氧化酶 (NADH oxidase, NOX) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	CE012-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	100ml	-20°C
试剂二: 液体	20ml	-20°C
试剂三: 液体	1.5ml	-20°C
试剂四: 液体	25ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂五: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 5ml 蒸馏水, 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

自备仪器和用品:

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

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 10 μ l 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g, 4°C 离心 5min。
- ③ 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11100g, 4°C 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)。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



⑤ 步骤④中的沉淀即为线粒体，加入 200 μ l 试剂二和 2 μ l 试剂三，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。

血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 5min。

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ l 样本、200 μ l 试剂四和 40 μ l 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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、血清（浆）NOX 活力的计算：

单位的定义：每 ml 血清（浆）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。

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

2、组织、细菌或细胞中 NOX 活力的计算：

(1) 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。

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

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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.25ml； V 样：加入样本体积，0.01ml； 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：样本质量； 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、血清（浆）NOX 活力的计算：

单位的定义：每 ml 血清（浆）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。

$NOX (U/ml) = \Delta A \times V_{反总} \div V_{样} \div 0.01 \div T = 5000 \times \Delta A$

2、组织、细菌或细胞中 NOX 活力的计算：

(1) 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。

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

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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



$NOX (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 1010 \times \Delta A \div W$

(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。

$NOX (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 2.02 \times \Delta A$

V反总: 反应体系总体积, 0.25ml; V样: 加入样本体积, 0.01ml; 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: 样本质量; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

