北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

NADH 氧化酶（NOX）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号： D17186
规格： 50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.5 mL×1 支	-20℃保存
试剂四	液体 70 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×2 瓶	-20℃保存

溶液的配制：

试剂六：临用前加入 9 mL 双蒸水，用不完的试剂-20℃分装保存。

产品说明：

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。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

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 10μL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g，4℃离心 5min。将上清液移至另一离心管中， 11000g，4℃离心 10min。
3. 将上清液转移至另一 EP 管中，即胞浆提取物，用于线粒体中泄露 NOX 活性测定。
4. 沉淀即为线粒体，加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，反复吹打充分混匀，用于 NOX 活性测定，并用于蛋白浓度测定。

二、测定步骤

1、 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。

2、 试剂四37℃保温放置。

3、 加样表如下：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
试剂四	700	700
试剂五	100	100
样本	40	40
蒸馏水		160
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℃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 ΔA=A1-A2，记录 ΔA 测定、 ΔA 对照， ΔA=ΔA 测定-ΔA 对照。

三、NOX 活力单位的计算

按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 蛋白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÷0.01×V反总÷(Cpr×V样)÷T=2500×ΔA÷Cpr

V反总：反应总体积， 1mL；V样：加入样本体积， 0.04mL；Cpr：样本蛋白浓度， mg/mL；T：反应时间， 1min。

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，试剂六样本在冰上放置，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。

6、附：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：加入试剂一体积， 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。

实验实例:

1、 取0.1g肺部样本进行样本处理， 按照测定步骤操作， 测得 ΔA1=ΔA 测定-ΔA 对照=（0.841-0.094）-（0.956-0.849）=0.64，ΔA2=ΔA 测定-ΔA 对照=(0.945-0.471)-(1.009-0.982)=0.447，按样本质量计算酶活得：

NOX 上清(U/g 质量）=2525×ΔA1÷W=2525×0.64÷0.1=16160

NOX 沉淀(U/g 质量）=505×ΔA2÷W=505×0.447÷0.1=2257.35

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

=2525×0.64÷0.1+505×0.447÷0.1=16160+2257.35=18417.35 U/g 质量。

2、 取 0. 1g 叶片样本进行样本处理，按照测定步骤操作，测得 ΔA1=ΔA 测定-ΔA 对照=（0.875-0.812）-(0.903- 0.888)=0.048 ，ΔA2=ΔA 测定-ΔA 对照=（0.919-0.868）-（0.91-0.879）=0.02 ，按样本质量计算酶活得：

NOX 上清(U/g 质量）=2525×ΔA1÷W=2525×0.048÷0. 1=1212

NOX 沉淀(U/g 质量）=505×ΔA2÷W=505×0.02÷0. 1=101

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

=2525×0.048÷0. 1+505×0.02÷0. 1=1313 U/g 质量。

