

NADH 氧化酶 (NADH oxidase, NOX) 试剂盒说明书

(货号: G0803W 微板法 96 样)

一、产品简介:

NADH 氧化酶 (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, 通过检测 NADH 于 340nm 处的下降速率, 即可得出 NADH 氧化酶活性的大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂×1 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂×3 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支再加 0.5mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、NADH 氧化酶 (NOX) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C低温环境):

- ① 称取约 0.2g 组织或收集 1000 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵冰浴匀浆, 转移至离心管后于 4°C×3000g 离心 20min。
- ② 小心吸取上清液 (弃沉淀) 移至另一离心管中, 4°C×16000g 离心 20min。用移液器移除上清液 (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))。留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200 μ L 试剂二, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 5s, 间隔 3s, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体 NOX 酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 设定温度 25°C, 调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 或于 25°C水浴锅中孵育 15min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂三	160
试剂四	10
试剂五	10
混匀, 室温 (25°C) 静置 3min	
样本	20
混匀, 室温 (25°C) 立即于 340nm 处读取 A1, 5min 后读取 A2, ΔA=A1-A2。	

【注】若ΔA 小于 0.01, 可以延长反应时间 T (如至 10min 或更长), 则改变后的反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NOX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NOX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 128.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.26 \times \Delta A$$

ε---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入试剂二的体积, 0.2mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 5min;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。