

NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10180

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, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 0.5 mL×1 支	-20°C保存
试剂四	液体 70 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂六	粉剂×2 瓶	-20°C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°C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 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。将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C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 200 μ L 试剂二和 2 μ L 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°C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°C 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 $\Delta A = A1 - A2$ ，记录 ΔA 测定、 ΔA 对照， $\Delta A = \Delta A$ 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。

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

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°C- 4°C 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°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 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。

$$\text{NOX 上清 (U/g 质量)} = \Delta A1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2525 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/g 质量)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 505 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{NOX (U/g 质量)} = \text{NOX 上清} + \text{NOX 沉淀} = 2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：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 $\Delta A1 = \Delta A$ 测定 - ΔA 对照 = (0.841 - 0.094) - (0.956 - 0.849) = 0.64， $\Delta A2 = \Delta A$ 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：

$$\text{NOX 上清 (U/g 质量)} = 2525 \times \Delta A1 \div W = 2525 \times 0.64 \div 0.1 = 16160$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/g 质量)} = 505 \times \Delta A2 \div W = 505 \times 0.447 \div 0.1 = 2257.35$$

$$\text{NOX (U/g 质量)} = \text{NOX 上清} + \text{NOX 沉淀} = 2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$$

$$= 2525 \times 0.64 \div 0.1 + 505 \times 0.447 \div 0.1 = 16160 + 2257.35 = 18417.35 \text{ U/g 质量。}$$

2、取 0.1g 叶片样本进行样本处理，按照测定步骤操作，测得 $\Delta A_1 = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 对照} = (0.875 - 0.812) - (0.903 - 0.888) = 0.048$ ， $\Delta A_2 = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 对照} = (0.919 - 0.868) - (0.91 - 0.879) = 0.02$ ，按样本质量计算酶活得：
NOX 上清 (U/g 质量) = $2525 \times \Delta A_1 \div W = 2525 \times 0.048 \div 0.1 = 1212$
NOX 沉淀 (U/g 质量) = $505 \times \Delta A_2 \div W = 505 \times 0.02 \div 0.1 = 101$
NOX (U/g 质量) = NOX 上清 + NOX 沉淀 = $2525 \times \Delta A_1 \div W + 505 \times \Delta A_2 \div W$
= $2525 \times 0.048 \div 0.1 + 505 \times 0.02 \div 0.1 = 1313$ U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Dou S, Liu S, Xu X, et al. Octanal inhibits spore germination of *Penicillium digitatum* involving membrane peroxidation[J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1539-1545.

[2] Liu P, Zhang H M, Hu K, et al. Sensory plasticity of carotid body is correlated with oxidative stress in paraventricular nucleus during chronic intermittent hypoxia[J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(8): 13534-13543.

[3] Yongtao Du, Mengjie Zhao, Changtao Wang, et al. Identification and characterization of GmMYB118 responses to drought and salt stress. *BMC Plant Biology*. December 2018; (IF3.67)

[4] Youqiang Xu, Chunyan Xu, Xiuting Li, et al. A combinational optimization method for efficient synthesis of tetramethylpyrazine by the recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*. January 2018; (IF3.371)

[5] Weida Li, Kai Wang, Nanfang Jiang, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of purified polysaccharides from *Ulva pertusa*. *Journal of Applied Phycology*. April 2018; (IF4.784)

参考文献：

[1] Kawai S, Mori S, Mukai T, et al. Cytosolic NADP phosphatases I and II from *Arthrobacter* sp. strain KM: implication in regulation of $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ balance[J]. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 2004, 44(3): 185-196.