

NADH 氧化酶(NOX)测试盒

(货号: BC114 分光光度法)

一、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。

二、测定原理:

NADH 氧化酶 (NADH oxidase, 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。

三、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、冰、蒸馏水

四、试剂的组成和配制(50T/48 样):

试剂一: 液体50mL×1 瓶, -20℃保存。

试剂二: 液体10mL×1 瓶, -20℃保存。

试剂三: 液体1mL×1 瓶, -20℃保存。

试剂四: 液体50mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂五: 液体6 mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂六: 粉剂×2 瓶, -20℃保存; 临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水, 用不完的试剂分装后 -20℃保存, 禁止反复冻融。

五、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℃离心5min。
- ③、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 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、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。

六、测定步骤:

- 1、分光光度计预热30min 以上, 调节波长至600nm, 蒸馏水调零。
- 2、样本测定:
 - (1) 试剂四、试剂五和试剂六于37℃(哺乳动物) 或25℃(其它物种) 孵育5min。
 - (2) 在1mL比色皿中加入40 μ L样本、700 μ L试剂四、100 μ L试剂五和160 μ L试剂六, 混匀, 记录600nm 处20s时吸光值A1和1min20s 后的吸光值A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

七、NOX 活力单位的计算

- 1、血清(浆) NOX 活力的计算:

单位定义: 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。

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

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：此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

单位定义：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。

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

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：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。

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

(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。

$$\text{NOX (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 1.01 \times \Delta A$$

V_{反总}：反应体系总体积，1mL；

V_样：加入样本体积，0.04mL；

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。