

NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC0630

规格: 50T/24S

产品内容:

试剂一: 液体 25mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂二: 液体 5mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 0.5mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂四: 液体 70mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂五: 液体 10 mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂六: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存; 临用前每瓶加入 9mL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃ 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。

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

操作步骤:

一、样品测定的准备:

- 1、组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:
- 2、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 3、将匀浆 600g, 4℃ 离心 5min。
- 4、将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃ 离心 10min。
- 5、将上清液转移至另一 EP 管中, 用于线粒体中泄露 NOX 活性测定。
- 6、沉淀即为线粒体, 加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三, 用于 NOX 活性测定。
- 7、NOX 总酶活即为上清中 NOX 活性与沉淀中 NOX 活性之和。

二、测定步骤和加样表:

- 1、可见分光光度计预热 30min 以上;
- 2、试剂四 37℃ 保温放置。

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 $\Delta A = A_1 - A_2$, 记录 A 测定、A 对照, $\Delta A_1 = \Delta A$ 上清测定 - ΔA 上清对照, $\Delta A_2 = \Delta A$ 沉淀测定 - ΔA 沉淀对照。

三、NOX 活力单位的计算:

A、上清中 NOX 活力的计算:

1、组织中 NOX 活力的计算:

(1) 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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A_1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr 上清} \times V_{\text{样本}}) = 2500 \times \Delta A_1 \div \text{Cpr 上清}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

$$\text{NOX (U/g 鲜重)} = \Delta A_1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) = 2525 \times \Delta A_1 \div W$$

2、细菌或培养细胞中 NOX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A_1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr 上清} \times V_{\text{样本}}) = 2500 \times \Delta A_1 \div \text{Cpr 上清}$$

(2) 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。

$$\text{NOX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A_1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) = 5.05 \times \Delta A_1$$

V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样本: 加入样本体积, 0.04mL; V 提取: 加入提取液体积, 1.01mL;
Cpr 上清: 上清中蛋白浓度, mg/mL; W, 样本鲜重, g; 500, 细菌或细胞总数, 500 万。

B、沉淀中 NOX 活力的计算:

1、组织中 NOX 活力的计算:

(1) 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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A_2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr 沉淀} \times V_{\text{样本}}) = 2500 \times \Delta A_2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

$$\text{NOX (U/g 鲜重)} = \Delta A_2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = 505 \times \Delta A_2 \div W$$

2、细菌或培养细胞中 NOX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A_2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr 沉淀} \times V_{\text{样本}}) = 2500 \times \Delta A_2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 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。

$$\text{NOX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = 1.01 \times \Delta A2$$

V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样本: 加入样本体积, 0.04mL; V 样总: 沉淀重悬体积, 0.202mL;
Cpr 沉淀: 沉淀重悬后蛋白浓度, mg/mL; W, 样本鲜重, g; 500, 细菌或细胞总数, 500 万。

C、样本 NOX 总活力的计算:

样本 NOX 总活力即为上清中 NOX 活力与沉淀中 NOX 活力之和。

1、组织中 NOX 活力的计算:

(1) 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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = 2500 \times \Delta A1 \div \text{Cpr 上清} + 2500 \times \Delta A2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

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

2、细菌或培养细胞中 NOX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = 2500 \times \Delta A1 \div \text{Cpr 上清} + 2500 \times \Delta A2 \div \text{Cpr 沉淀}$$

(2) 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。

$$\text{NOX (U/10}^4 \text{ cell)} = 5.05 \times \Delta A1 + 1.01 \times \Delta A2$$

注意事项:

- 1、粗酶液的提取必须在 0°C- 4°C 中操做完成, 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。