

NADH 氧化酶 (NADH oxidase, NOX) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

测定原理：

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

试剂的组成和配制：

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。

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 10uL 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 200uL 试剂二和 2uL 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。

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 石英比色皿中加入 40 μL 样本、700 μL 试剂四、100 μL 试剂五和 160 μL 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 $\Delta A=A1-A2$ 。

NOX 活力单位的计算

1、血清（浆）NOX 活力的计算:

单位的定义：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:

单位的定义：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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义：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:

单位的定义：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。

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

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。