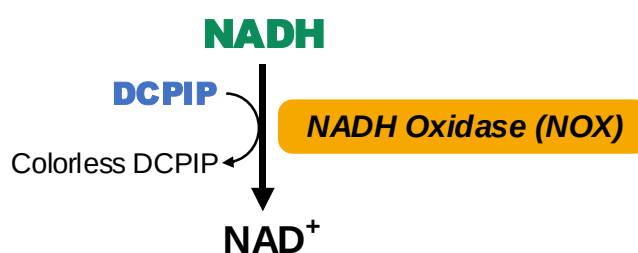




NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒

NADH Oxidase (NOX) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒

NADH Oxidase (NOX) Activity Assay Kit

一、产品描述

NADH 氧化酶 (NOX) 能够直接将 NADH 氧化为 NAD^+ ，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，在氧化态辅酶的再生方面具有重要应用潜力，并且作为细胞内重要的氧化代谢酶，能够清除细胞内氧毒素，对维持细胞内氧平衡具有重要意义。

NADH 氧化酶能够将 NADH 氧化为 NAD^+ ，并能够将蓝色的 2,6 二氯酚靛蓝 (DCPIP) 还原为无色的 DCPIP，蓝色 DCPIP 在 600 nm 处具有特征吸收峰，通过测定其还原速率即可表征 NADH 氧化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液 A	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 C	液体 1 mL×1 支	-20°C 避光保存	-
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 2 周，避免反复冻融)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液 A 和 10 μL 提取液 C，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 600 g 离心 5 min，弃沉淀，留上清；

②吸取步骤①离心后上清液至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 10 min；

③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 NOX 活性；

④步骤②离心后沉淀中加入 200 μL 提取液 B 和 2 μL 提取液 C，冰浴超声破碎（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）即为粗酶液，可用于 NOX 活性测定（可用于蛋白测定含量）。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 600 nm，蒸馏水调零。

②灭活粗酶液的制备：吸取适量粗酶液至离心管中，沸水浴处理 10 min（密封以防止水分散失），冷却至室温，即为灭活粗酶液。

③试验前将试剂一 37℃预热后使用，并置于 37℃保温放置。

④在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)
粗酶液	10	-
灭活粗酶液	-	10
试剂一	175	175
试剂二	25	25
试剂三	40	40

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 20 s（总时间）时 600 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②37℃准确反应 60 s，测定 80 s（总时间）时 600 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算 ΔA 测定 = A1 测定 - A2 测定， ΔA 对照 = A1 对照 - A2 对照， $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 对照。注：每个样品均需设一个对照组。

3. NADH 氧化酶（NOX）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}}}{0.005 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{5000 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟使 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

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

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积，0.25 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1 min。

四、注意事项

- ①粗酶液制备过程须在 0℃-4℃条件下完成，以防止酶变性失活；
- ②试验过程中试剂三需置于冰上放置；
- ③准确在 20 s 和 80 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔板应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ④试剂三配制后有效期较短，为便于试验安排，附赠一瓶作为备用，每瓶均可满足至少 50 个样本的测定用量；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；
- ⑥推荐使用组织蛋白浓度计算活性，若使用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和即为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

(1) 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清 NOX (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V1}{0.005 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{5050 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀 NOX (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V2}{0.005 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1010 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{NOX (U/g)} = \text{上清 NOX} + \text{沉淀 NOX} = \frac{5050 \times \Delta A1}{W} + \frac{1010 \times \Delta A2}{W}$$

(2) 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟使 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清 NOX (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V1}{0.01 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2525 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀 NOX (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V2}{0.01 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{505 \times \Delta A2}{W}$$

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

注释：ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积，0.25 mL；V1：提取过程中加入提取液 A 和提取液 C 的体积，1.01 mL；V2：提取过程中加入提取液 B 和提取液 C 的体积，0.202 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1 min。

