



组织 NADPH 氧化酶活性光度法定量检测试剂盒产品说明书

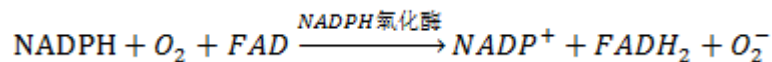
(货号: A127-1-1 比色法 20T)

主要用途:

组织 NADPH 氧化酶活性光度法定量检测试剂是一种旨在使用特异性抑制剂,通过反应系统测定样品中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化后峰值的降低,即采用光度法测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适合于各种组织样品(动物或人体)还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NADPH 氧化酶)的特异活性检测。用于免疫、血液研究、蛋白组学、病理生理学等研究。产品不含污染性蛋白酶,严格无菌,即到即用,操作简捷,性能稳定,反应优化,检测敏感。

技术背景

NADPH氧化酶,通常称为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NADPH oxidase; EC1.6.3.1)或还原型辅酶II氧化酶,是机体防御机制中的重要元素。NADPH氧化酶由6个亚体构成:Rho GTP酶(Rho guanosine triphosphatase)和5个phox(吞噬细胞氧化酶; phagocytic oxidase)。其中主要包含细胞膜嵌合蛋白质分子(gp91phox、p22phox、flavocytochrome b558等),以及位在细胞质内的蛋白质分子(p47phox、p67phox、p40phox、Rac1、Rac2等)。其最特征性的酶活性是超氧化物歧化酶敏感的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶。细胞膜上的NADPH氧化酶被激活,将还原型辅酶II(NADPH)转变为氧化型辅酶II(NADP⁺),氧分子则获得电子形成超氧阴离子O₂⁻,由O₂⁻又可生成H₂O₂和OH⁻。其超氧阴离子产物具有杀死微生物的功能。NADPH氧化酶异常将导致慢性肉芽肿病(Chronic Granulomatous Disease; CGD)。基于底物还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),在特异性抑制剂联苯基三价碘(diphenyleneiodonium; DPI)的存在下,受到NADPH氧化酶的催化作用,转化为氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP⁺),产生吸光峰值的变化,通过分光光度仪(340nm波长)检测,来测定NADPH氧化酶的特异活性。其反应方式为:



试剂组成:

清理液(Reagent A) 30mL×1 瓶
裂解液(Reagent B) 5 mL×1 瓶
缓冲液(Reagent C) 20 mL×1 瓶
反应液(Reagent D) 2.5 mL×1 瓶
阴性液(Reagent E) 2 mL×1 瓶
底物液(Reagent F) 500 μL×1 支
专性液(Reagent G) 200μL×1 支

保存方式:

保存清理液(Reagent A)和阴性液(Reagent E)在4℃冰箱里,其余的保存在-20℃冰箱里,避免反复冻融;反应液(Reagent D)和底物液(Reagent F),避免光照,有效保证6月

用户自备

15 毫升锥形离心管:用于样品操作的容器
1.5 毫升离心管:用于样品操作和保存的容器
4℃(微型)台式离心机:用于样品处理
DOUNCE 匀浆器:用于裂解组织细胞
恒温培养箱或恒温水槽:用于反应物孵育
比色皿:用于光度测定的容器
分光光度仪:用于光度分析



实验步骤:

实验开始前, 将 -20°C 冰箱里的试剂盒中的试剂溶液置入冰槽里融化; **反应液 (Reagent D)** 和**底物液 (Reagent F)** 注意避光。然后进行下列操作。

一、样品准备

1. 手术取出动物组织, 并称重以确定 500 毫克组织重量
2. (选择步骤) 放进预冷的 15 毫升锥形离心管
3. (选择步骤) 加入 3 毫升**清理液 (Reagent A)** 清洗 1 次
4. 移入到一个液氮冻存管
5. 即刻放进液氮罐过夜
6. 次日从液氮罐里取出, 即刻 (最快速度) 用研磨棒碾碎组织成粉末状 (注意: *切莫使组织冻融*)
7. 放进一个 15 毫升锥形离心管
8. 加入 500 微升**裂解液 (Reagent B)**
9. 强力涡旋震荡 30 秒, 充分混匀
10. 放进冰槽里孵育 30 分钟, 期间每 10 分钟强力涡旋震荡 30 秒
(注意: *如需暂时停止, 放进 -70°C 冰箱里储存备用*)
11. 即刻放进 4°C 台式离心机离心 10 分钟, 速度为 10000g
12. 小心移取上清液到新的无菌的 1.5 毫升离心管
13. 移取 10 微升进行蛋白定量检测
(注意: *建议使用蛋白质浓度定量试剂盒 (考马斯亮蓝法-A045-2)*)
14. 放进 -70°C 的冰箱里保存或置于冰槽里备用

二、测定准备

1. 从 -70°C 取出待测样品 (例如组织裂解悬液样品等), 置于冰槽里
2. 设定好分光光度仪 (温度为 30°C): 波长为 340nm, 间隔 30 秒, 读数 5 次 (共 2 分钟), 置零
3. **缓冲液 (Reagent C)** 室温预热

三、背景对照测定

1. 移取 780 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 100 微升**反应液 (Reagent D)**
3. 加入 20 微升**底物液 (Reagent F)**
4. 放进 30°C 培养箱里静置 3 分钟
5. 加入 100 微升**阴性液 (Reagent E)**
6. 上下倾倒数次, 混匀 (限定在 3 秒之内)
7. 即刻放入分光光度仪检测, 此为背景空对照: (340 波长读数) 0 分钟- (340 读数) 2 分钟

四、样品总活性测定

1. 移取 780 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 100 微升**反应液 (Reagent D)**
3. 加入 20 微升**底物液 (Reagent F)**
4. 放进 30°C 培养箱里静置 3 分钟
5. 加入 100 微升待测样品 (注意: *300 至 350 微克组织裂解悬液蛋白; 样品须溶解*)
6. 上下倾倒数次, 混匀 (限定在 3 秒之内)
7. 即刻放入分光光度仪检测, 此为样品总活性读数: (340 波长读数) 0 分钟- (340 读数) 2 分钟

五、样品非特异活性测定



1. 准备 1 个 1.5 毫升离心管
2. 加入 20 微升**专性液 (Reagent G)**
3. 加入 100 微升待测样品 (注意: 300 至 350 微克组织裂解悬液蛋白; 样品须溶解)
4. 放进 30°C 培养箱里静置 5 分钟
5. 放进冰槽里备用
6. 移取 760 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
7. 加入 100 微升**反应液 (Reagent D)**
8. 加入 20 微升**底物液 (Reagent F)**
9. 放进 30°C 培养箱里静置 3 分钟
10. 加入上述冰槽里的 120 微升含有**专性液 (Reagent G)** 和待测样品的溶液
11. 上下倾倒数次, 混匀 (限定在 3 秒之内)
12. 即刻放入分光光度仪检测, 此为样品非特异活性读数: (340 波长读数) 0 分钟 - (340 读数) 2 分钟

六、计算样品活性

1) 样品总活性和非特异活性

$[(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times 1 (\text{体系容量; 毫升}) \times \text{样品稀释倍数}] \div [0.1 (\text{样品容量; 毫升}) \times 6.22 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times 2 (\text{反应时间; 分钟})] = \text{单位/毫升或微摩尔 NADPH/分钟/毫升} \div (\text{样品蛋白浓度}) \text{毫克/毫升} = \text{单位/毫克或微摩尔 NADPH/分钟/毫克}$

或者

$[(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times 1 (\text{体系容量; 毫升}) \times \text{样品稀释倍数}] \div [0.3 (\text{样品蛋白量; 毫克}) \times 6.22 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times 2 (\text{反应时间; 分钟})] = \text{单位/毫克或微摩尔 NADPH/分钟/毫克}$

2) 样品特异活性

样品总活性 - 样品非特异活性 = 样品特异活性

注意事项

1. 本产品为 21 次 (10 个样本) 操作, 包括 1 次背景对照测定
2. 操作时, 须戴手套
3. **反应液 (Reagent D)** 和**底物液 (Reagent F)** 注意避光
4. 系统操作过程中, 背景测定只需 1 次
5. 样品检测前, 须溶解和澄清
6. 加样后 3 秒内进行光度测定
7. 建议使用分光光度仪检测
8. 光度测定后, 比色皿须清洗彻底
9. 样品 0 秒读数通常和背景空对照 0 秒读数一致; 如果为总蛋白样品, 样品 0 秒读数通常大于背景空对照 0 秒读数
10. 反应测定值由高到低变化; 测定持续 2 分钟
11. 测定值由高到低变化, 表明有酶活性
12. 建议待测样本蛋白浓度为 300 至 350 微克/100 微升; 如果样本酶活性过低, 则可以增加样本量, 建议使用蛋白质浓度定量试剂盒 (考马斯亮蓝法 - A045-2)
13. 如果使用纯化目标蛋白, 则蛋白浓度为 1 至 5 微克/100 微升; 如果使用纯化膜蛋白, 则蛋白浓度为 10 微克/100 微升
14. 样品实际活性是指联苯基三价碘 (diphenyleneiodonium; DPI) 敏感的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶, 去除其它干扰因素
15. NADPH 氧化酶活性单位浓度定义: 在 30°C 室温下, pH 7.0 的情况下, 每单位酶在单位时间内 (每分钟) 氧化 1 微摩尔的还原型辅酶 II (NADPH)