



# NADH 氧化酶(NOX)测试盒说明书

（货号：A116-1-1 分光光度法 50T/48 样）

## 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：（试剂盒有效期3个月）

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10μL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200μL 试剂二和2μL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40μL样本、700μL试剂四、

100μL试剂五和160μL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。

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

### 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。

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

（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。

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

（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。

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

**V<sub>反应</sub>：**反应体系总体积，1mL；

**V<sub>样</sub>：**加入样本体积，0.04mL；

**V<sub>样总</sub>：**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。