

NADH氧化酶（NADH oxidase, NOX）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰、蒸馏水

试剂的组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，-20℃保存；

试剂二：液体20mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：液体1.5mL×1瓶，-20℃保存；

试剂四：液体25mL×1瓶，4℃保存。

试剂五：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入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：

- 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。
- 将匀浆600g，4℃离心5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11100g，4℃离心10min。
- 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）。
- 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。

测定步骤：

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

（1）试剂四于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育5min。

（2）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、200μL试剂四和40μL试剂五，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

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

V反总：反应体系总体积，0.25mL； V样：加入样本体积，0.01mL； 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。

b.使用96孔板测定的计算公式如下：

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0.005定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 5000 \times \Delta A$$

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0.005定义为一个酶活力单位。

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

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0.005定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 1010 \times \Delta A \div W$$

(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0.005定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 2.02 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.25mL； V样：加入样本体积，0.01mL； 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。
