

# NADH 氧化酶 (NOX) 检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1004

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌

## 产品简介

NADH 氧化酶 (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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 NADH 氧化酶 (NOX) 的活性水平。其原理是 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 NOX 的活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
试剂一	50mL	100mL	-20℃保存
试剂二	12mL	24mL	4℃保存
试剂三	0.75mL	1.5mL	4℃保存
试剂四	12mL	24mL	4℃保存
试剂五	1	1	-20℃保存

## 自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 600nm 处的吸光度）及恒温箱  
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头  
低温离心机、制冰机  
去离子水  
匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂五：临用前配制；用前 96T 试剂五瓶中加入 5mL 去离子水，48T 试剂五瓶中加入 2.5mL 去离子水，未用完试剂分装-20℃保存，实验时冰上放置，避免反复冻融。

## 样本制备

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  $5 \times 10^6$  细胞，加入 1mL 试剂一和 10  $\mu$ L 试剂三，用匀浆器冰上匀浆。
2. 将匀浆液，600g，4℃离心 5min。
3. 将上清液移至另一离心管中，11,000g，4℃离心 10min。

## 产品说明书

- (选做)上清液即为胞浆提取物,可作为样本用于测定从线粒体泄漏的 NOX (此步可选做,可用于判断线粒体提取效果)。
- 第二次沉淀即为线粒体,在沉淀中加入 200 $\mu$ L 试剂二和 2  $\mu$ L 试剂三,充分重悬沉淀,用于 NOX 活性测定。注意:样品处理等过程均需要在冰上进行,如果不立即进行实验,样本可在-80 $^{\circ}$ C 保存一个月。

### 实验步骤

- 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长到 600nm,可见分光光度计去离子水调零。
- 试剂四置于 25 $^{\circ}$ C (一般物种)或者 37 $^{\circ}$ C (哺乳动物)预热 30min。
- 样本测定:在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10  $\mu$ L 样本,200  $\mu$ L 试剂四和 40  $\mu$ L 试剂五。充分混匀,记录 600nm 处 10s 时吸光值  $A_1$ ,迅速放入 25 $^{\circ}$ C (一般物种)或者 37 $^{\circ}$ C (哺乳动物)恒温箱中,准确反应 1min。迅速取出记录 1min 10s 时的吸光度  $A_2$ 。计算  $\Delta A=A_1-A_2$ 。  
注意:1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果  $\Delta A$  小于 0.001 可适当加大样本量;如果  $\Delta A$  大于 0.4,可用试剂二稀释样品,计算时结果乘以稀释倍数。  
2. 测定反应的温度对测定结果有影响,请控制在 25 $^{\circ}$ C (一般物种)或者 37 $^{\circ}$ C (哺乳动物)。  
3. 因通过反应速率计算酶活,使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数(通常一次测定 4-8 个样本)。

### 结果计算

#### NOX 活力单位的计算

##### A. 使用 96 孔板测定的计算公式

###### 1. 按样本鲜重计算:

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

$$\text{NOX 上清 (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{上清}} \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 5050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

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

$$\text{NOX 总 (U/g 鲜重)} = \text{NOX}_{\text{上清}} + \text{NOX}_{\text{沉淀}} = 5050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 1010 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

###### 2. 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义:每  $10^4$  个细菌或细胞在反应体系中每分钟 A600 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX 上清 (U/10}^4 \text{ Cells)} = \Delta A_{\text{上清}} \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 10.1 \times \Delta A_{\text{上清}}$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/10}^4 \text{ Cells)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 2.02 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

$$\text{NOX 总 (U/10}^4 \text{ Cells)} = 10.1 \times \Delta A_{\text{上清}} + 2.02 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

##### B. 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

###### 1. 按样本鲜重计算:

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

$$\text{NOX 上清 (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{上清}} \div 0.01 \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2525 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

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

$$\text{NOX 总 (U/g 鲜重)} = \text{NOX}_{\text{上清}} + \text{NOX}_{\text{沉淀}} = 2525 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 505 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

###### 2. 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义:每  $10^4$  个细菌或细胞在反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX 上清 (U/10}^4 \text{ Cells)} = \Delta A_{\text{上清}} \div 0.01 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 5.05 \times \Delta A_{\text{上清}}$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/10}^4 \text{ Cells)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div 0.01 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.01 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

$$\text{NOX 总 (U/10}^4 \text{ Cells)} = 5.05 \times \Delta A_{\text{上清}} + 1.01 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

W: 样本鲜重, 0.1g; T: 反应时间, 1min;  $V_{\text{反应}}$ : 反应体系总体积, 0.25mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.01mL;  $V_{\text{提取}}$ : 加入提取液体积, 1.01mL;  $V_{\text{样总}}$ : 沉淀重悬体积, 0.202mL; 500: 细胞或细菌总数,  $5 \times 10^6$ 。

### 注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验,尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究,如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途,我们将不对任何后果负责。
- 本试剂盒应在有效期内使用,并请严格按照说明书进行存储。
- 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用;否则,可能导致结果异常。
- 勤换吸头,避免各组分之间的交叉污染。

## 产品说明书

相关产品：

PMK0999 辅酶 I NAD(H) 检测试剂盒（微量法）

PMK1000 NAD 激酶（NADK）检测试剂盒（微量法）

PMK1005 柠檬酸合酶（CS）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

