

NADPH 氧化酶 (NAO) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1124

保存: -20°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织、细胞、真菌

产品简介

NADPH 氧化酶 (NAO) 广泛存在于动物、植物和真菌中, 是一个典型的膜蛋白, 催化 NADPH 氧化生成 NADP⁺, 并将电子传递给氧原子从而产生超氧阴离子。该酶异常可导致人慢性肉芽肿病 (GCD), 在植物中, 该酶与其抗病性和各种胁迫有密切关系。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 NADPH 氧化酶 (NAO) 的活性水平。其原理是 NADPH 氧化酶 (NAO) 将 NADPH 氧化为 NADP⁺, NADPH 在 340nm 有特征吸收峰, 而 NADP⁺ 没有; 通过测定 340nm 吸光度减少的速率来计算得出 NAO 酶活性大小。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
提取液	50mL	100mL	4°C 保存
反应缓冲液	10mL	20mL	4°C 保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20°C 保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340nm 处的吸光度)
96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
恒温箱、制冰机、低温离心机
去离子水
匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

提取液: 即用型; 4°C 保存。

反应缓冲液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂一: 临用前配制; 用前 96T 加入 5mL 去离子水, 48T 加入 2.5mL 去离子水, 未用完试剂分装 -20°C 保存, 实验时冰上放置, 避免反复冻融。

样本制备

动植物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 预冷的提取液, 冰浴匀浆, 12,000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

细胞: 收集 5×10^6 个细胞, 用冷 PBS 清洗细胞后弃上清, 加入 1mL 预冷的提取液冰浴超声波破碎 5min (功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次)。12,000g, 4°C, 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

血清、血浆等液体样本: 可直接测定, 根据预实验确定稀释倍数。

注意: 建议使用新鲜样本。如果不立即使用, 可将样品在 -80°C 下保存一个月。如需测定蛋白浓度, 推荐使用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 340nm, 可见分光光度计去离子水调零。

产品说明书

2. 反应缓冲液置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）预热 15min。

3. 样本测定：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μL 样本，150 μL 反应缓冲液和 40 μL 试剂一。充分混匀，记录 340nm 处 1min 20s 时吸光值 A_1 ，迅速放入 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）恒温箱中，准确反应 5min。迅速取出记录 6min 20s 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 ΔA 小于 0.001 可延长反应时间 T（如至 10min 或更长），或适当加大样本量；注意对计算公式进行调整。如果 ΔA 大于 1.0，可用提取液稀释样品，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℃（一般物种）或者 37℃（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

NAO 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

活力单位定义：一定条件下，每 g 样品在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

2. 按液体体积计算

活力单位定义：一定条件下，每 mL 液体样本在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

3. 按细胞数量计算

活力单位定义：一定条件下，每 10^4 个细胞或细菌在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/10^4 \text{ Cells}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div 500 = 2.572 \times \Delta A$$

(4) 按蛋白浓度计算

活力单位定义：一定条件下，每毫克蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 10^9 ： $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积， $10 \mu\text{L} = 0.01\text{mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1mL； Cpr ：上清液蛋白浓度 mg/mL； W ：样品质量，g； T ：反应时间，5min；500：细胞数量，500 万。

B. 使用微量石英比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm 调整为 d ：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1011 辅酶 II NADP(H) 检测试剂盒（微量法）

PMK1015 NADP 苹果酸酶（NADP-ME）检测试剂盒（微量法）

PMK1016 NAD-苹果酸酶（NAD-ME）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

