

NADH氧化酶（NOX）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1239

产品规格：100管/48样

产品简介：

NOX（EC1.6.99.3）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。

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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体50mL×1瓶	4℃
试剂二	液体10mL×1瓶	4℃
试剂三	液体1mL×1支	-20℃
试剂四	液体35mL×1瓶	4℃
试剂五	液体5mL×1瓶	4℃
试剂六	粉剂×2瓶	-20℃

溶液的配制：

试剂六：临用前加入4.5mL双蒸水，用不完的试剂-20℃分装保存。

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、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
- 3) 将上清液转移至另一EP管中，即胞浆提取物，用于线粒体中泄露NOX活性测定。
- 4) 沉淀即为线粒体，加入200μL试剂二和2μL试剂三，反复吹打充分混匀，用于NOX活性测定，并用于蛋白浓度测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。
2. 试剂四37℃保温放置。
3. 加样表：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂四	175	175
试剂五	25	25
样本	10	10
蒸馏水		40



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂六	40	-
-----	----	---

将上述试剂按顺序在微量玻璃比色皿/96孔板中操作，加入试剂六后立即混匀，同时开始计时，在600nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入37℃水浴中，准确反应1分钟。迅速取出比色皿并擦干，记录1分20秒时的吸光度A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，记录 ΔA 测定、 ΔA 对照， $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 对照。96孔板放于就近的恒温箱中，有些酶标仪带有内控温度设置的请设置为37℃，1分钟后再次测量即可。

三、NOX活力单位的计算

A 用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

按样本蛋白浓度计算

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

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

V反总：反应总体积，0.25mL；V样：加入样本体积，0.01mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1min。

B 用96孔板测定的计算公式如下

按样本蛋白浓度计算

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

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

V反总：反应总体积，0.25mL；V样：加入样本体积，0.01mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1min。

注意事项：

1. 粗酶液的提取必须在0℃-4℃中操作完成，以防止酶变性失活。
2. 比色皿中反应液的温度最好保持37℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
4. 实验时，试剂六样本在冰上放置，以免变性和失活。
5. 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量。
6. 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
7. 附：使用样本质量计算公式

A、按微量玻璃比色皿计算：

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。

$$\text{NOX上清 (U/g质量)} = \Delta A1 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2525 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{NOX沉淀 (U/g质量)} = \Delta A2 \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 505 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{NOX (U/g质量)} = \text{NOX上清} + \text{NOX沉淀} = 2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V反总：反应总体积，0.25mL；V样：加入样本体积，0.01mL；V提取：加入试剂一体积，1.01mL；V样总：沉淀重悬体积，0.202mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1min。

B、按96孔UV板计算：

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。

$$\text{NOX (U/g质量)} = \Delta A1 \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 5050 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{NOX (U/g质量)} = \Delta A2 \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1010 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{NOX (U/g质量)} = \text{NOX上清} + \text{NOX沉淀} = 5050 \times \Delta A1 \div W + 1010 \times \Delta A2 \div W$$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V反总：反应总体积，0.25mL；V样：加入样本体积，0.01mL；V提取：加入提取液体积，1.01mL；V样总：沉淀重悬体积，0.202mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1min。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com