

NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC0630

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.5 mL×1 支	-20℃保存
试剂四	液体 70 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×2 瓶	-20℃保存

溶液的配制:

试剂六: 临用前加入 9 mL 蒸馏水, 用不完的试剂-20℃分装保存。

产品说明:

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。

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。

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/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、加样表如下：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂四	700	700
试剂五	100	100
样本	40	40
蒸馏水	-	160
试剂六	160	-

将上述试剂按顺序在 1mL 玻璃比色皿中操作，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°C 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。

三、NOX 活力单位的计算

按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 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。

NOX 活性 (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，1mL；V 样：加入样本体积，0.04mL；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°C-4°C 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°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 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、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为总酶活。

6、附：使用样本鲜重计算公式：

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。

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

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

NOX 活性 (U/g 质量) = NOX 上清 + 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，1mL；V 样：加入样本体积，0.04mL；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。

实验实例：

- 1、取 0.1g 肺部样本进行样本处理，按照测定步骤操作，测得 $\Delta A1 = \Delta A$ 测定 - ΔA 对照 = (0.841 - 0.094) - (0.956 - 0.849) = 0.64， $\Delta A2 = \Delta A$ 测定 - ΔA 对照 = (0.945 - 0.471) - (1.009 - 0.982) = 0.447，按样本质量计算酶活得：
NOX 上清活性 (U/g 质量) = $2525 \times \Delta A1 \div W = 2525 \times 0.64 \div 0.1 = 16160$
NOX 沉淀活性 (U/g 质量) = $505 \times \Delta A2 \div W = 505 \times 0.447 \div 0.1 = 2257.35$
NOX 活性 (U/g 质量) = NOX 上清 + NOX 沉淀 = $2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$
= $2525 \times 0.64 \div 0.1 + 505 \times 0.447 \div 0.1 = 16160 + 2257.35 = 18417.35$ U/g 质量。



2、取 0.1g 叶片样本进行样本处理，按照测定步骤操作，测得 $\Delta A_1 = \Delta A$ 测定- ΔA 对照 = (0.875-0.812) - (0.903-0.888) = 0.048, $\Delta A_2 = \Delta A$ 测定- ΔA 对照 = (0.919-0.868) - (0.91-0.879) = 0.02, 按样本质量计算酶活得:

NOX 上清活性 (U/g 质量) = $2525 \times \Delta A_1 \div W = 2525 \times 0.048 \div 0.1 = 1212$

NOX 沉淀活性 (U/g 质量) = $505 \times \Delta A_2 \div W = 505 \times 0.02 \div 0.1 = 101$

NOX 活性 (U/g 质量) = NOX 上清 + NOX 沉淀 = $2525 \times \Delta A_1 \div W + 505 \times \Delta A_2 \div W$
= $2525 \times 0.048 \div 0.1 + 505 \times 0.02 \div 0.1 = 1313$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Pan Y, Jiang Y, Wan J, Hu Z, Jiang H, Shen L, Tang B, Tian Y, Liu Q. Expression of expanded GGC repeats within NOTCH2NLC causes cardiac dysfunction in mouse models. *Cell Biosci.* 2023 Aug 29;13(1):157. doi: 10.1186/s13578-023-01111-6. PMID: 37644522; PMCID: PMC10466825.
- [2] Fang C, Zuo K, Jiao K, Zhu X, Fu Y, Zhong J, Xu L, Yang X. PAGln, an Atrial Fibrillation-Linked Gut Microbial Metabolite, Acts as a Promoter of Atrial Myocyte Injury. *Biomolecules.* 2022 Aug 15;12(8):1120. doi: 10.3390/biom12081120. PMID: 36009014; PMCID: PMC9405855.
- [3] Zhang X, Liang S, Wu Q, Charles TC, He R, Wu J, Zhao Y, Zhao Z, Wang H. Mode of action of nanochitin whisker against *Fusarium pseudograminearum*. *Int J Biol Macromol.* 2022 Sep 30;217:356-366. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.056. Epub 2022 Jul 14. PMID: 35839953.
- [4] Wang K, Chen Y, Zhu X, Zou W, Zhou F. Ginkgo biloba Extract Attenuates Light-Induced Photoreceptor Degeneration by Modulating CAV-1-Redoxosome Signaling. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jun 27;11(7):1268. doi: 10.3390/antiox11071268. PMID: 35883759; PMCID: PMC9311990.
- [5] Ackah S, Bi Y, Xue S, Yakubu S, Han Y, Zong Y, Atuna RA, Prusky D. Post-harvest chitosan treatment suppresses oxidative stress by regulating reactive oxygen species metabolism in wounded apples. *Front Plant Sci.* 2022 Aug 2;13:959762. doi: 10.3389/fpls.2022.959762. PMID: 35982700; PMCID: PMC9379280.

参考文献:

- [1] Kawai S, Mori S, Mukai T, et al. Cytosolic NADP phosphatases I and II from *Arthrobacter* sp. strain KM: implication in regulation of NAD⁺/NADP⁺ balance[J]. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 2004, 44(3): 185-196.

相关系列产品:

- BC0310/BC0315 辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC1040/BC1045 NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒

