

NADH 氧化酶（NOX）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC0635

规格：100T/48S

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 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 1 mL×1 支	-20℃保存
试剂四	液体 35 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 5 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 4.5 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/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，分光光度计蒸馏水调零。
- 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
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°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。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°C,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,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。

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

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°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、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; $V \text{ 反总}$: 反应总体积, 0.25mL; $V \text{ 样}$: 加入样本体积, 0.01mL; $V \text{ 提取}$: 加入试剂一体积, 1.01mL; $V \text{ 样总}$: 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。

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

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

NOX 活性 (U/g 质量) = NOX 上清 + 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; $V \text{ 反总}$: 反应总体积, 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; W : 样本质量, g; T : 反应时间, 1min。

实验实例:

- 1、取 0.1g 肺进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得 $\Delta A1 = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 对照} = (0.8136 - 0.118) - (0.9216 - 0.8079) = 0.5819$, $\Delta A2 = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 对照} = (0.8546 - 0.4736) - (0.9539 - 0.9121) = 0.3392$, 按样本质量计算酶活得:

NOX 上清活性 (U/g 质量) = $2525 \times \Delta A1 \div W = 2525 \times 0.5819 \div 0.1 = 14692.975$

NOX 沉淀活性 (U/g 质量) = $505 \times \Delta A2 \div W = 505 \times 0.3392 \div 0.1 = 1712.96$

NOX 活性 (U/g 质量) = NOX 上清 + NOX 沉淀 = $2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$
 $= 2525 \times 0.5819 \div 0.1 + 505 \times 0.3392 \div 0.1 = 16405.935 \text{ U/g 质量}。$

- 2、取 0.1g 叶片进行样本处理, 按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得 $\Delta A1 = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 对照} = (0.8518 - 0.7998) - (0.886 - 0.8831) = 0.0491$, $\Delta A2 = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 对照} = (0.872 - 0.8296) - (0.916 - 0.9149) = 0.0413$, 按样本质量计算酶活得:

NOX 上清活性 (U/g 质量) = $2525 \times \Delta A1 \div W = 2525 \times 0.0491 \div 0.1 = 1239.775$

NOX 沉淀活性 (U/g 质量) = $505 \times \Delta A2 \div W = 505 \times 0.0413 \div 0.1 = 208.565$

NOX 活性 (U/g 质量) = NOX 上清 + NOX 沉淀 = $2525 \times \Delta A1 \div W + 505 \times \Delta A2 \div W$
 $= 2525 \times 0.0491 \div 0.1 + 505 \times 0.0413 \div 0.1 = 1448.34 \text{ U/g 质量}。$

相关发表文献:

[1] Zheng Q, Liu H, Zhang H, Han Y, Yuan J, Wang T, Gao Y, Li Z. Ameliorating Mitochondrial Dysfunction of Neurons by Biomimetic Targeting Nanoparticles Mediated Mitochondrial Biogenesis to Boost the Therapy of Parkinson's Disease. Adv Sci (Weinh). 2023 Aug;10(22):e2300758. doi: 10.1002/advs.202300758. Epub 2023 May 18. PMID: 37202595; PMCID: PMC10401119.

[2] Chen L, Tian Q, Shi Z, Qiu Y, Lu Q, Liu C. Melatonin Alleviates Cardiac Function in Sepsis-Caused Myocarditis via Maintenance of Mitochondrial Function. Front Nutr. 2021 Oct 11;8:754235. doi: 10.3389/fnut.2021.754235. PMID: 34708067; PMCID: PMC8542660.

[3] Shen T, Lyu D, Zhang M, Shang H, Lu Q. Dioscin Alleviates Cardiac Dysfunction in Acute Myocardial





Infarction via Rescuing Mitochondrial Malfunction. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Mar 4;9:783426. doi: 10.3389/fcvm.2022.783426. PMID: 35310994; PMCID: PMC8931042.

[4] Zhang H, Yan X, Lin A, Xia P, Su Y. Inhibition of ghrelin activity by the receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 enhances hepatic fatty acid oxidation and gluconeogenesis in a growing pig model. *Peptides.* 2023 Aug;166:171041. doi: 10.1016/j.peptides.2023.171041. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37301480.

[5] 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.

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 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 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

