

NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase) 试剂盒说明书

(货号: BP10032W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

NADPH 氧化酶 (NAO) 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。广泛存在于动物、植物和真菌中。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。

NADPH 氧化酶 (NAO) 将 NADPH 氧化为 NADP^+ 的同时生成超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$), 接着与显色剂反应生成水溶性的黄色物质。对照通过添加该酶的特异性抑制剂 DPI 排除背景值。最终检测生成的有色物质在 450nm 处的吸光值, 即可计算得出 NAO 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 70mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 0.25mL×1 支	-20℃ 避光保存	1. 若凝固可放置室温或 25℃ 水浴溶解。 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃ 避光保存	
试剂三	粉体 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	液体 1mL×1 支	-20℃ 避光保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见匀浆器)。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清作为待测液。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），设定温度 37℃，调节波长至 450nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
提取液	150	145
试剂一		5
37℃孵育 5min（可能会产生沉淀，但不影响后续测定）		
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
37℃避光孵育 20min，于 450nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】若 ΔA 的值在零附近，可以延长反应时间 T（如至 40min 或更长），则改变后的反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min}/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按液体体积计算：

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 0.5 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

T---反应时间，20min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。