

NADH 氧化酶（NADH oxidase, NOX）试剂盒说明书

（货号：BP10442F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

NADH 氧化酶（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，通过检测 NADH 于 340nm 处的下降速率，即可得出 NADH 氧化酶活性的大小。

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
试剂一	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.5mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 3 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.5mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。

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）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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，以免造成样本或试剂不必要的浪费！

1、线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境）：

- ① 称取约 0.2g 组织或收集 1000 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵冰浴匀浆，转移至离心管后于 4℃×3000g 离心 20min。
- ② 小心吸取上清液（弃沉淀）移至另一离心管中，4℃×16000g 离心 20min。用移液器移除上清液（上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的 NOX（此步可选做））。留下沉淀（沉淀即为线粒体）。
- ③ 在沉淀（线粒体）中加入 200 μL 试剂二，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 5s，间隔 3s，重复 30 次），液体置于冰上用于线粒体 NOX 酶活性测定。

【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，或按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
试剂三	640
试剂四	20
试剂五	20
混匀，室温 (25℃) 静置 3min	
样本	60
混匀，室温 (25℃) 立即于 340nm 处读取 A1，5min 后读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$	

【注】若 ΔA 的值在零附近，可以延长反应时间 T（如至 10min 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、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NOX (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 396.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NOX (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 79.3 \times \Delta A \div W$$

3、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氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.16 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.2mL； V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积， $7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； T---反应时间，5min；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 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。