

NADH 氧化酶（NADH oxidase, NOX）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃ 保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂×3 支	-20℃ 保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支再加 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、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、NADH 氧化酶（NOX）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂三	160
试剂四	10
试剂五	10

混匀，室温（25℃）静置 3min	
样本	20
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。

$$\text{NOX (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\text{NOX (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 128.6 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NOX (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.26 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V--- 加入提取液体积，0.2mL；

V1--- 加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} 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。