

## NADH 氧化酶 (NADH oxidase, NOX) 试剂盒说明书

### 分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 测定意义:

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。

#### 测定原理:

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。

#### 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、冰、蒸馏水

#### 试剂的组成和配制:

试剂一: 液体 50mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂二: 液体 10mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂三: 液体 1mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂四: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂五: 液体 6 mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂六: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存; 临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

#### 样本的前处理:

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 10 $\mu$ L 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g, 4℃ 离心 5min。
- ③ 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃ 离心 10min。
- ④ 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)。
- ⑤ 步骤④中的沉淀即为线粒体, 加入 200 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ L 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于 NOX 活性测定。

血清 (浆) 样品: 直接检测。

#### 测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 试剂四、试剂五和试剂六于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min。

(2) 在 1mL 石英比色皿中加入 40  $\mu$ L 样本、700  $\mu$ L 试剂四、100  $\mu$ L 试剂五和 160  $\mu$ L 试剂六, 混匀, 记录 600nm 处 20s 时吸光值 A1 和 1min20s 后的吸光值 A2, 计算  $\Delta A=A1-A2$ 。

### NOX 活力单位的计算

#### 1、血清（浆）NOX 活力的计算:

单位的定义：每 mL 血清（浆）在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A$$

#### 2、组织、细菌或细胞中 NOX 活力的计算:

##### (1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 2500 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

##### (2) 按样本鲜重计算:

单位的定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 505 \times \Delta A \div W$$

##### (3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每分钟 A600 变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 1.01 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1mL； V 样：加入样本体积，0.04mL； V 样总：加入提取液体积，0.202 mL； T：反应时间，1 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量； 500：细胞或细菌总数，500 万。