

CheKine™ NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1021

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是 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 600 nm 下测定蓝色 DCPIP 的还原速率计算出 NOX 的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Sample Lysis Buffer	60 mL	60 mL×2	-20℃
Mitochondria Lysis Buffer	12 mL	24 mL	4℃
Protease Inhibitor	0.75 mL	1.5 mL	-20℃
Chromogen	12 mL	24 mL	4℃, 避光保存
Substrate	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 600 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、超声破碎仪、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	需要手动研磨

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 不同样本的 NOX 最佳的反应温度略有差别，可在 25-37℃ 之间进行调节。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，建议一次检测一个样本。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Sample Lysis Buffer	即用型；使用前平衡到室温	-20℃ 保存
Mitochondria Lysis Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Protease Inhibitor	即用型；使用前平衡到室温	-20℃ 保存；有一定毒性，建议在通风橱进行实验
Chromogen	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 避光保存
Working Substrate	临用前配制；向 Substrate 加入 5 mL 去离子水，充分溶解	实验时冰上放置；未用完的试剂-20℃ 避光分装保存 1 个月，避免反复冻融

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 1 个月。

- 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 0.1 g 组织样本或收集 5×10^6 个细胞或细菌，加入 1 mL Sample Lysis Buffer 和 10 μ L Protease Inhibitor，用匀浆器冰上匀浆。
 2. 将匀浆液 600 g，4℃ 离心 5 min。
 3. 将上清液移至另一离心管中，11000 g，4℃ 离心 10 min。

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）。第二次沉淀即为线粒体，加入 200 μ L Mitochondria Lysis Buffer 和 2 μ L Protease Inhibitor，超声波破碎 5 min（功率 20%，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），用于 NOX 活性测定。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 600 nm。
2. Chromogen 置于 25 $^{\circ}$ C（其它物种）或者 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）恒温箱中孵育 30 min。
3. 检测体系配制：按如下体系在酶标板中进行检测体系配制。空白孔一般只做 1 次。

试剂	空白孔 (μ L)	测定孔 (μ L)
Sample	0	10
Sample Lysis Buffer	50	0
Chromogen	200	200
Working Substrate	0	40

4. 吸光度检测：充分混匀，记录 600 nm 处 10 s 时吸光值 A_1 ，迅速放入 25 $^{\circ}$ C（其它物种）或者 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）恒温箱中，准确反应 1 min。迅速取出记录 1 min 10 s 时的吸光度 A_2 。测定孔记为 $A_{\text{测定}}$ ，空白孔记为 $A_{\text{空白}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = (A_{1\text{测定}} - A_{2\text{测定}}) - (A_{1\text{空白}} - A_{2\text{空白}})$ 。

2. 样本 NOX 活性计算

● 按样本蛋白浓度计算

酶活定义：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。

$$\text{NOX (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 5000 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div C_{\text{pr}}$$

● 按样本质量计算

酶活定义：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。

$$\text{NOX 上清 (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{上清}} \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 5050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

$$\text{NOX 沉淀 (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1010 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

$$\text{NOX 总 (U/g 鲜重)} = \text{NOX}_{\text{上清}} + \text{NOX}_{\text{沉淀}} = 5050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 1010 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

● 按细胞或细菌数量计算

酶活定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟 A600 变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NOX (U/10}^4\text{)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T = 1010 \times \Delta A \div N$$

C_{pr} ：沉淀蛋白浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；T：反应时间，1 min； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.25 mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：沉淀重悬体积，0.202 mL；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细菌数量为 5×10^6 ，N=500）。

注意：若用样本鲜重计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。

07 结果展示

示例-1: 取 0.1 g 拟南芥，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{上清}}=(A_{1\text{ 测定}}-A_{2\text{ 测定}})-(A_{1\text{ 空白}}-A_{2\text{ 空白}})$
 $= (1.0317-0.9350)-(1.0763-1.0750)=0.0954$ ， $\Delta A_{\text{沉淀}}=(A_{1\text{ 测定}}-A_{2\text{ 测定}})-(A_{1\text{ 空白}}-A_{2\text{ 空白}})$
 $= (0.9693-0.9083)-(1.0763-1.0750)=0.0597$ 。按样本质量计算得：NOX 总(U/g 鲜重)=NOX_{上清}+NOX_{沉淀}
 $=5050\times\Delta A_{\text{上清}}\div W+1010\times\Delta A_{\text{沉淀}}\div W=5420.67\text{ U/g 鲜重}$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 ΔA 过高或者过低怎么办？
如果样本 $\Delta A>1.0$ ，上清可用 Sample Lysis Buffer、沉淀可用 Mitochondria Lysis Buffer 适当稀释或减少提取用样本量，重新进行测定。如果样本的 $\Delta A<0.02$ ，可提高样本量或延长反应时间。

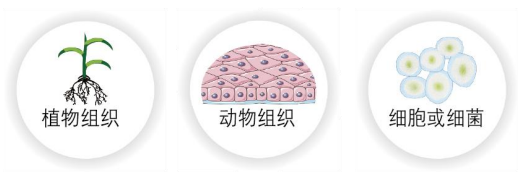
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1020	CheKine™ 辅酶 I NAD(H) 含量检测试剂盒（微量法）
KTB1010	CheKine™ 辅酶 II NADP(H) 含量检测试剂盒（微量法）
KTB1041	CheKine™ 过氧化氢（H ₂ O ₂ ）检测试剂盒（微量法）

CheKine™ NADH氧化酶（NOX）活性检测流程示意图

(Abbkine 货号：KTB1021)

样本处理



1 mL Sample Lysis Buffer和10 μ L Protease Inhibitor，用匀浆器冰上匀浆



600 g，4℃离心5 min，取上清
11000 g，4℃离心10 min



加入200 μ L Mitochondria Lysis Buffer和
2 μ L Protease Inhibitor，超声破碎5 min
(功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次)



(选做)

体系配置

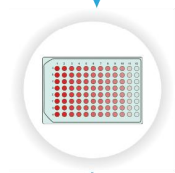


Sample 10 μ L
Chromogen 200 μ L
Working Substrate 40 μ L



Sample Lysis Buffer 50 μ L
Chromogen 200 μ L

数据检测



充分混匀，测定600 nm 10 s和25℃(一般物种)或者37℃
(哺乳动物)准确反应1 min 后的吸光度
结果计算