

## NADPH氧化酶(NAO)活性试剂盒

规格：100管/48 样

检测原理：微量法

编号：JLC\_K14905

检测波长：450nm

### 注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

### 测定原理

NADPH 氧化酶 (NAO) 是一个典型的膜蛋白，催化 NADPH 氧化生成 NADP<sup>+</sup>，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<sup>+</sup>的同时生成超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)，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。

### 所需的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰、水浴锅和蒸馏水。

### 试剂盒组分与配制

提取液：液体 60mL ×1 瓶，4°C保存；

试剂一：液体 22mL ×1 支，-20°C保存；

试剂二：液体 0.6mL ×1 支，-20°C避光保存；

试剂三：粉体 ×2 支，-20°C避光保存；

试剂四：液体 3mL ×1 支，-20°C避光保存；

### 样本提取

**1、组织样本：**取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，在 4°C 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。离心 10min (12,000 rpm 4°C)，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）；离心 10min (12,000 rpm 4°C)，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) 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。

## 二、实验准备：

1、酶标仪预热 30min 以上，设定温度 37°C，所有试剂平衡至室温，调节波长至 450nm。

2、试剂三的配制：用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。  
(用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融，三天内用完)

3、工作液的配制：将试剂一：试剂三：试剂四按9：2：5体积比混匀，避光，现配现用，半小时内有效。

## 操作测定

1、在96孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂二		10
试剂一	100	90
37°C 孵育 10min (可能会产生沉淀，但不影响后续测定)		
工作液	80	80
振板 5 s，酶标仪于 450 nm 处检测各孔吸光度值，记为 A1，37°C 避光孵育 10min，450 nm 处再次检测各孔吸光度值，记为 A2， $\Delta A = A2 - A1$		

【注】：若 $\Delta A$  的值在零附近，可以延长反应时间 T (如至 20min 或更长)，则改变后的反应时间 T 需代入公式重新计算。

## 结果计算

### 1、按样本鲜重计算：

酶活定义：37°C 条件下，每千克组织每分钟催化底物产生1 μmol 产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{NAO活力(U/kg 鲜重)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}) \div (\epsilon \times d) \times V1 \div V2 \times V \div m \div T \times f \times 1000$$

### 2、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：37°C 条件下，每 $1 \times 10^6$  个细胞每分钟催化底物产生1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{NAO活力(U/10}^6\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}) \div (\epsilon \times d) \times V1 \div V2 \times V3 \div n \div T \times f \times 1000$$

ε：摩尔消光系数，37 L/mmol/cm

d：比色光径，0.5 cm

V1：检测反应总体积，200 μL

V2：样本加入体积，20 μL

m：匀浆样本质量，kg

V：组织匀浆液体积，L

T：反应时间，10 min

n：细胞个数/ $1 \times 10^6$ 个

V3：细胞样本匀浆液体积，L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

1000：1 mmol/L = 1000 μmol/L

## **预实验的意义**

### **比色法检测试剂盒预实验非常重要**

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3-5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。