

## 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： ml301016

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。

### 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；

## 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。

### 一、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。

### 三、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。**

#### 四、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  $\mu\text{mol}$  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  $\mu\text{mol}$  的产物所需要的酶活为一个活力单位。

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

$\epsilon$ : 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  $\mu\text{L}$

V2: 样本加入体积, 20  $\mu\text{L}$

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:  $1 \text{ mmol/L} = 1000 \text{ } \mu\text{mol/L}$

#### 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最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。