

NADPH 氧化酶（NADPH oxidase）试剂盒说明书

（ 微板法 48 样）

一、产品简介：

NADPH 氧化酶（NAO）是一个典型的膜蛋白，催化 NADPH 氧化生成 NADP⁺，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⁺的同时生成超氧阴离子(O₂^{·-})，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。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 0.25mL×1 支	-20℃ 保存	若凝固可放置室温或 25℃ 水浴溶解。
试剂二	液体 1mL×1 支	-20℃ 保存	
试剂三	粉体 mg×2 支	-20℃ 保存	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℃ 保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	液体 1mL×1 支	-20℃ 保存	

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、NADPH 氧化酶（NAO）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、样本制备

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。4℃×12000rpm 离心 10min，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）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 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。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设定温度 37℃，调节波长至 450nm。

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	对照管
样本	20	20
提取液	150	145

试剂一		5
37°C 孵育 5min (可能会产生沉淀, 但不影响后续测定)		
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
37°C 避光孵育 20min, 于 450nm 读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照。		

【注】若 ΔA 的值在零附近, 可以延长反应时间 T (如至 40min 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在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div W$$

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在反应体系中使 450nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$NAO(\Delta OD_{450}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 0.5 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

T---反应时间, 20min;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 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。