

## NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase) 活性

微板法 100 管/48 样>

**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

### 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<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 0.25mL × 1 支，-20°C保存①

试剂二：液体 1mL × 1 支，-20°C保存；

试剂三：粉体 ×2 支，-20°C保存；

试剂四：液体 1mL × 1 支，-20°C保存；

### 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。

① 若凝固可放置室温或 25°C水浴溶解。

### NADPH 氧化酶 (NAO) 活性测定：

#### 一、样本制备：

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 (12,000rpm 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 (12,000rpm 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<sup>4</sup>)：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。

#### 二、实验准备：

1、酶标仪预热 30min 以上，设定温度 37°C，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、所有试剂解冻至室温 (25°C)。

三、操作测定:

1、**NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase) 活性** 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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】: 若  $\Delta A$  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。

结果计算:

2、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。

$$\text{NAO}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T$$

$$= 250 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、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。

$$\text{NAO}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V_1 \div V) \div 0.01 \div T$$

$$= 250 \times \Delta A \div W$$

4、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。

$$\text{NAO}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V_1 \div V) \div 0.01 \div T$$

$$= 0.5 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

T---反应时间, 20min;

建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

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；

**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。