

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K815-M

产品规格: 48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience[®]NADPH 氧化酶 (NAO)

比色法测试盒

NADPH Oxidase (NAO) Activity

Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动植物组织以及细胞样本中 NADPH 氧化酶(NAO)的活性。

检测原理

NADPH 氧化酶(NADPH Oxidase, NAO)是一种膜蛋白,主要存在于哺乳动物嗜中性粒细胞、植物细胞和丝状真菌细胞中,最初在吞噬细胞膜中被发现。NAO 能够将 NADPH 氧化成 NAD^+ 的同时生成超氧阴离子,是体内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的主要来源之一。NAO 参与许多重要的生理过程,包括宿主防御、蛋白质后翻译修饰、细胞信号传导、基因表达调控和细胞分化。

本试剂盒作用原理为 NAO 催化底物生成的产物与显色剂反应生成显色物质,在 450 nm 处有最大吸收,通过测定 450 nm 处 OD 值大小计算 NAO 酶活。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	11 mL×1 瓶	22 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.3 mL×1 支	0.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
	酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		

	样本位置标记表	1 张	
--	---------	-----	--

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)、恒温箱

试剂准备

① 检测前，所有试剂需平衡至室温(25°C)待用。

② 试剂四工作液配制：

取一支试剂四粉剂用550 μ L双蒸水溶解得到试剂四工作液，未使用完的试剂四工作液可-20°C避光保存一周。

③ 工作液配制：

将试剂二：试剂四工作液：试剂五按9：2：5体积比混匀，避光，现配现用，半小时内有效。

样本准备

① 样本处理

组织样本：按组织样本质量(g)：试剂一体积(mL) = 1：9的比例进行匀浆，如0.1 g组织，加入0.9 mL试剂一。4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入200 μ L试剂一进行匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2 - 3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围0.27-43.43 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	2-10	10%玉米组织	不稀释
10%小鼠脾组织	不稀释	10%大蒜组织	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	10%西蓝花组织	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	1×10^6 个 HeLa 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织	不稀释	1×10^6 个 RAW 264.7 细胞	不稀释
10%土豆组织	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 试剂三需要平衡到室温，在添加试剂二之前单独添加，不可将试剂二和试剂三先混合后添加，否则会产生大量沉淀。

② 对照孔可能会有少量沉淀，不影响实验结果。

操作步骤

- ① 测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的对照孔加入 10 μL 试剂三。
- ③ 向步骤①中的测定孔加入 100 μL 试剂二。
向步骤②中的对照孔加入 90 μL 试剂二。
- ④ 振板 5 s, 37°C 孵育 10 min。
- ⑤ 向步骤④各孔加入 80 μL 工作液。
- ⑥ 振板 5 s, 酶标仪于 450 nm 处检测各孔吸光度值, 记为 A_1 , 37°C 孵育 10 min, 450 nm 处再次检测各孔吸光度值, 记为 A_2 。

操作表

	测定孔	对照孔
待测样本(μL)	20	20
试剂三(μL)	--	10
试剂二(μL)	100	90
振板 5 s, 37°C 孵育 10 min		
工作液(μL)	80	80
振板 5 s, 酶标仪于 450 nm 处检测各孔吸光度值, 记为 A_1 , 37°C 孵育 10 min, 450 nm 处再次检测各孔吸光度值, 记为 A_2		

结果计算

① 组织样本中 NADPH 氧化酶(NAO)活力计算公式:

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。

$$\text{NAO 活力 (U/kg wet weight)} = \frac{\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{对}}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{m}{V} \div T \times f \times 1000$$

② 细胞样本中 NADPH 氧化酶(NAO)活力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每 1×10^9 个细胞每分钟催化底物产生 1 nmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{NAO 活力 (U/10^9)} = \frac{\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{对}}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{n}{V_3} \div T \times f \times 1000$$

注解:

$\Delta A_{\text{测}}$: 测定孔 OD 变化值, $A_2 - A_1$

$\Delta A_{\text{对}}$: 对照孔 OD 变化值, $A_2 - A_1$

ε : 摩尔消光系数, 30.7 L/mmol/cm

d : 比色光径, 0.6 cm

V_1 : 检测反应总体积, 200 μL

V_2 : 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/ 1×10^6 个

V_3 : 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

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.27-43.43 U/L	批间差	5.0-9.5%
灵敏度	0.27 U/L	批内差	2.7-4.1%
稀释回收率	95-103%		

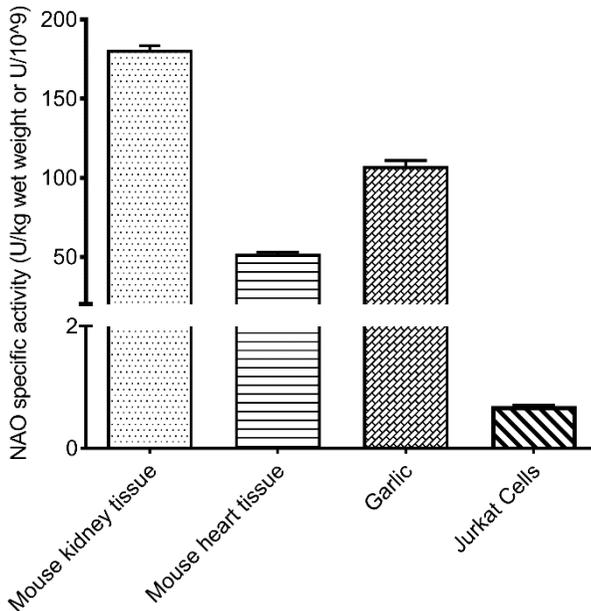
附录2 实例分析

例如检测小鼠肾组织(数据仅供参考):

取 20 μL 稀释 2 倍的 10%小鼠肾组织匀浆上清液, 按操作表操作, 结果如下: 测定孔初始吸光度值 A_1 为 0.171, 反应 10 min 后测得吸光度值 A_2 为 0.379, $\Delta A_{\text{测}} = A_2 - A_1 = 0.379 - 0.171 = 0.208$ 。对照孔初始吸光度值 A_1 为 0.202, 反应 10 min 后测得吸光度值 A_2 为 0.225, $\Delta A_{\text{对}} = A_2 - A_1 = 0.225 - 0.202 = 0.023$ 计算结果为:

$$\text{NAO 活力(U/kg wet weight)} = (0.208 - 0.023) \div (30.7 \times 0.6) \times (200 \div 20) \div (0.0001 \div 0.0009) \div 10 \times 2 \times 1000 = 180.78 \text{ U/kg wet weight}$$

按说明书操作, 测定小鼠肾(10%组织匀浆, 稀释2倍, 加样量20 μL)、小鼠心脏(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、大蒜(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、Jurkat细胞(2×10^6 个, 加样量20 μL)中NOA活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

