（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-K806-M

产品规格：48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(590-610 nm)

Elabscience®NADH 氧化酶（NOX）比色法测试盒

NADH Oxidase (NOX) Activity 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和细胞样本中的 NADH 氧化酶（NOX）的活力。

检测原理

NADH 氧化酶（NOX）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，可在氧气存在下，直接将 NADH 氧化为 NAD^+，同时蓝色的 DCPIP 被还原为无色的 DCPIP，在 600 nm 下测定蓝色 DCPIP 的还原速率计算出 NOX 酶活大小。

本试剂盒检测组织与细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

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 A (Extraction Solution A)	50 mL × 1 瓶	50 mL × 2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	15 mL × 1 瓶	30 mL × 1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.8 mL × 1 支	0.8 mL × 2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL × 1 瓶	20 mL × 1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 A (Substrate A)	1.2 mL × 1 支	1.2 mL × 2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 B (Substrate B)	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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(590-610 nm，最佳检测波长 600 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂六工作液的配制：

取一支试剂六加入1.2 mL双蒸水，溶解后置于冰盒上避光备用，未用完部分进行分装，-20°C避光可保存3天。

样本准备

① 样本处理

组织样本：取0.1 g组织样本加入0.9 mL试剂一和10 μL试剂三匀浆，4°C 600 × g离心5 min，弃沉淀取上清。上清液12000 × g低温离心15 min，弃上清取沉淀。沉淀加入200 μL试剂二与2 μL试剂三混匀，超声5 min。12000 × g低温离心10 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取1×10^6个细胞加入0.4 mL试剂一和4 μL试剂三匀浆，600 × g 4°C离心5 min，弃沉淀取上清。上清液12000 × g低温离心15 min，弃上清取沉淀。沉淀加入200 μL试剂二与2 μL试剂三混匀，超声5 min。12000 × g低温离心10 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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：0.38-22.09 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	5-10	10%小鼠肾组织	3-5
10%小鼠心组织	2-3	10%小鼠肌肉组织	不稀释
10%猪心组织	1-3	10%牛肝组织	5-8
10%大鼠脑组织	不稀释	10%绿萝	不稀释

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

该反应速率较快，所以单次样本测试数量不得超过 3 个。

操作步骤

① 空白孔：取 20 μL 双蒸水加入到空白孔中。

测定孔：取 20 μL 样本上清液加入到测定孔中。

② 向步骤①中加入 140 μL 试剂四。

③ 向步骤②中加入 20 μL 试剂五。

④ 向步骤③中加入 20 μL 试剂六工作液。

⑤ 酶标仪 600 nm 波长下测定 30 s 的 OD 值 A_1 和 1 min 30 s 的 OD 值 A_2，计算单位时间内的变化 OD 值 ΔA，$\Delta A=A_1 - A_2$。

操作表

	空白孔	测定孔
双蒸水(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂四(μL)	140	140
试剂五(μL)	20	20
试剂六工作液(μL)	20	20
酶标仪 600 nm 波长下测定 30 s 的 OD 值 A_1 和 1 min 30 s 的 OD 值 A_2，计算单位时间内的变化 OD 值ΔA，$\Delta A=A_1 - A_2$。		

本试剂盒检测组织与细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

组织与细胞样本中 NADH 氧化酶（NOX）活力计算公式：

定义：室温条件下，每克组织或细胞线粒体蛋白每分钟水解底物生成 1 mmol 氧化型 DCPIP 所需要的 NADH 氧化酶为一个酶活力单位。

$$\underset{(U/gprot)}{NOX} = \frac{(\Delta A_{测} - \Delta A_{空})}{21.8^* \times 0.6} \div C_{pr} \div T \times f \times 1000^*$$

注解:

$\Delta A_{测}$：测定孔变化 OD 值(A_1-A_2)

$\Delta A_{空}$：空白孔变化 OD 值(A_1-A_2)

21.8*：DCPIP 摩尔吸光系数，L/mol/cm

0.6：96 孔板光径，cm

C_{pr}：样本线粒体蛋白浓度，gprot/L

T：反应时间，1 min

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

1000*：1 mol = 1000 mmol

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.38-22.09 U/L	**平均批间差**	7.1 %
灵敏度	0.38 U/L	**平均批内差**	4.0 %
平均回收率	102 %		

附录2 实例分析

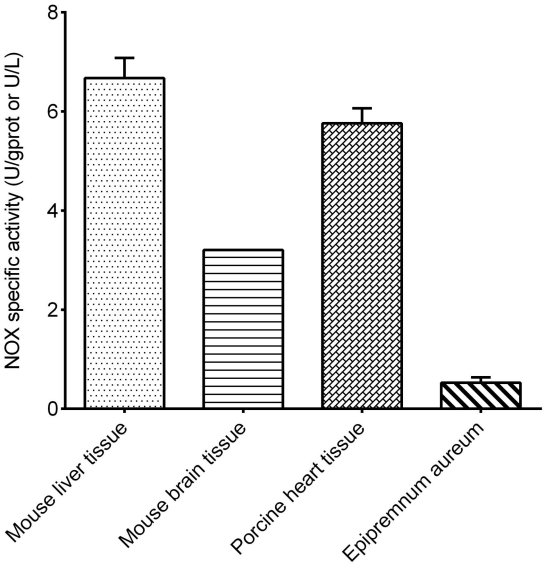
例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考)：

制备的10%小鼠肝组织线粒体匀浆，用试剂二稀释5倍，取稀释后的样本20 μL，按操作表操作，结果如下：空白孔A_1值为0.763，A_2值为0.757，测定孔A_1值为0.439，A_2值为0.187，10%线粒体匀浆蛋白浓度为10.71 gprot/L，计算结果为：

$$\underset{(U/gprot)}{NOX} = ((0.439 - 0.246) - (0.763-0.757)) \div (21.8 \times 0.6) \div 10.71 \div 1 \times 5 \times 1000$$

$$= 6.67\ U/gprot$$

按说明书操作，测定小鼠肝线粒体上清液(10%线粒体匀浆蛋白浓度为10.71 gprot/L，稀释5倍，加样量20 μL)、小鼠脑线粒体上清液(10%线粒体匀浆蛋白浓度为4.65 gprot/L，稀释3倍，加样量20 μL)、猪心线粒体上清液(10%线粒体匀浆蛋白浓度为1.61 gprot/L，稀释3倍，加样量20 μL)、绿萝线粒体上清液(10%线粒体匀浆蛋白浓度为0.51 gprot/L，加样量20 μL)中的NOX活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
A_1 值小于 0.4	样本酶活较大，底物在短时间内迅速反应	将样本上清稀释到合适的浓度
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

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。