NADPH 氧化酶活性测试盒

比色法：20T/10 样

一、反应原理：

细胞膜上的 NADPH 氧化酶被激活，将还原型辅酶Ⅱ（NADPH）转变为氧化型辅酶Ⅱ（NADP+），氧分子则获得电子形成超氧阴离子 O2-，由 O2-又可生成 H2O2 和 OH－。其超氧阴离子产物具有杀死微生物的功能。NADPH 氧化酶异常将导致慢性肉芽肿病（Chronic Granulomatous Disease；CGD）。基于底物还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH），在特异性抑制剂联苯基三价碘（diphenyleneiodonium；DPI）的存在下，受到 NADPH 氧化酶的催化作用，转化为氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP+），产生吸光峰值的变化，通过分光光度仪（340nm 波长）检测，来测定 NADPH 氧化酶的特异活性。其反应方式为：

二、试剂组成:

清理液（Reagent A） 30 毫升
裂解液（Reagent B） 5 毫升
缓冲液（Reagent C） 20 毫升
反应液（Reagent D） 2.5 毫升
阴性液（Reagent E） 2 毫升
底物液（Reagent F） 500 微升
专性液（Reagent G） 200 微升

三、保存方式:

保存清理液（Reagent A）和阴性液（Reagent E）在 4℃冰箱里，其余的保存在－20℃冰箱里，避免反复冻融；反应液（Reagent D）和底物液（Reagent F），避免光照，有效保证 6 月

四、用户自备:

15 毫升锥形离心管：用于样品操作的容器
1.5 毫升离心管：用于样品操作和保存的容器
4℃（微型）台式离心机：用于样品处理
DOUNCE 匀浆器：用于裂解组织细胞
恒温培养箱或恒温水槽：用于反应物孵育
比色皿：用于光度测定的容器
分光光度仪：用于光度分析

五、实验步骤:

实验开始前，将－20℃冰箱里的试剂盒中的试剂溶液置入冰槽里融化；反应液（Reagent D）和底物液（Reagent F）注意避光。然后进行下列操作。

1、样本提取详见试剂盒内说明书。测定组织和细胞同时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）或总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

2、测定准备

1. 从-70℃取出待测样品（例如组织裂解悬液样品等），置于冰槽里
2. 设定好分光光度计：30℃、波长为 340nm，间隔 30 秒，读数 5 次（共 2 分钟），置零
3. 缓冲液（Reagent C）室温预热

3、操作表

	阴性对照孔	样本总活性	样本非特异活性
试剂三（μl）	780	780	760
试剂四（μl）	100	100	100
试剂六（μl）	20	20	20
轻摇混匀，30℃孵育 3min			
试剂五（μl）	100		
待测样本(μl)		100	100
试剂七(μl)			20

充分混匀，波长 340nm，测定初始吸光度值 A0；转入 30℃孵育箱（或者在 30℃水浴箱）中温浴 2min，即刻放入分光光度计测定吸光度值 A2

六、单位定义及活性计算公式

NADPH 氧化酶活性单位浓度定义：在 30℃室温下，pH 7.0 的情况下，每单位酶在单位时间内（每分钟）氧化 1 微摩尔的还原型辅酶Ⅱ（NADPH）