

一氧化氮合成酶试剂盒

规格：100 管/96 样

检测原理：微量法

编号：ml301002

检测波长：550nm

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

测定意义：

一氧化氮合成酶（NitricOxideSynthase, NOS, EC 1.14.13.39）是生物体内催化 L-精氨酸合成 NO 的一类酶，主要存在于血管平滑肌、巨噬细胞、内皮细胞、神经细胞、肝细胞、肾小球膜细胞等各种细胞中。NO 作为细胞信息分子，在神经系统、免疫系统和心血管系统中起着重要的调节作用。

根据其酶活性对钙离子的依赖性不同，分为结构型 NOS（constitutiveNOS, cNOS）和损伤诱导型 NOS（inducible NOS, iNOS），前者需要一定浓度的钙离子方可激活，后者不依赖于外源钙离子。

测定原理：

NOS 催化 L-精氨酸、分子氧和 NADPH，生成 NO 和 NADP⁺，NO 在水溶液中极易氧化生成 NO²⁻和 NO³⁻。在酸性条件下，NO²⁻与重氮盐磺胺生成重氮化合物，进一步与萘基乙烯基二胺偶合，产物在 550nm 处有特征吸收峰，测定其吸光值，可以计算得到 NOS 活性大小。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液一	液体 60mLx1	-20℃保存	
提取液二	液体 1mLx2	-20℃密封保存	
缓冲液	液体 20mLx1	2-8℃保存	
试剂一	粉剂 x1	2-8℃避光保存	临用前加入 15mL 缓冲液溶解
试剂二	液体 1.5mLx1	-20℃避光保存	
试剂三	粉剂 x1	-20℃避光保存	临用前加 1mL 缓冲液溶解
试剂四	粉剂 x1	-20℃避光保存	临用前加 1mL 缓冲液溶解
试剂五	液体 6mLx1	2-8℃避光保存	如有析出，可适当加热溶解
试剂六	液体 6mLx1	2-8℃避光保存	用之前 60℃加热震荡 15min
试剂七	液体 1mLx1	-20℃避光保存	
标准品	液体 1mLx1	2-8℃避光保存	10μmol/mL 亚硝酸钠

- 1、提取液二：为易挥发试剂，用后尽快密封；
- 2、工作液 A 配置为试剂一：试剂二：试剂三：试剂四按照 12.5mL：1.5mL：1mL：0.07mL 的比例混合，-20℃保存 1 周；
- 3、工作液 B 配置为试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂七按照 12.2mL：1.5mL：1mL：0.07mL：0.3mL 的比例混合，-20℃保存 1 周；
- 4、显色液：临用前按照试剂五：试剂六 1：1 充分混匀，现用现配；
- 5、临用前取 10μL 10μmol/mL 亚硝酸钠标准液，加入 990μL 蒸馏水，配制成 0.1μmol/mL 亚硝酸钠标准液，现配现用。

样品提取：

一、组织样本的处理：

称取 0.2g 组织样本加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴匀浆后，12000g，4℃离心 15min，取上清至冰上待测；

二、细胞样本处理：

取约 1000 万细菌或细胞加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，超声波破碎(冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，12000g，4℃离心 15min，取上清至冰上待测；

三、液体样本处理：

澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测；

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，设置温度在 37℃，调节波长至 550nm。

2、在 EP 管中加入下列试剂：

试剂 (μL)	总 NOS 测定管 (A 测定 1)	iNOS 测定管 (A 测定 2)	空白管 (A 空白) (只做一管)	标准管 (A 标准) (只做一管)
样本	60	60		
工作液 A	140			
工作液 B		140		
混匀，37℃反应 60min，沸水浴 5min（缠封口膜，防止爆盖），冷却后 4℃，11000g 离心 10min，取上清待测				

3. 在 96 孔板中加入下列试剂：

注意事项：

上清液	100	100		
标准液				30
蒸馏水			100	70
显色液	100	100	100	100
混匀，常温静置 10min，测定 550nm 处各管吸光值，分别记为 A 测定 1、A 测定 2、A 标准和 A 空白。 计算 ΔA 测定 1=A 测定 1-A 空白， ΔA 测定 2=A 测定 2-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准管只需测 1-2 次				

1、NOS 稳定性差，易变性失活，建议使用新鲜样本实验，如果不立即实验，样本需-20℃保存。

2、如果 ΔA 测定小于 0.005 或测定管吸光值接近空白管，可以增加样本量或者延长第一步 37°C 反应时间后再进行测定；

3、如果 ΔA 测定大于 0.5，建议将样本匀浆后的上清液用提取液一适当稀释后再进行测定。

注意同步修改计算公式。

结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmolNO 定义为一个酶活单位。

总 NOS 活性(U/mg prot)= (ΔA 测定 1 $\div\Delta A$ 标准 $\times C$ 标准) $\times V$ 样 $\div$ (Cpr $\times V$ 样) $\times 10^3\div$

T $\times F$

=1.67 $\times\Delta A$ 测定 1 $\div\Delta A$ 标准 $\div Cpr\times F$

iNOS 活性(U/mg prot)= (ΔA 测定 2 $\div\Delta A$ 标准 $\times C$ 标准) $\times V$ 样 $\div$ (Cpr $\times V$ 样) $\times 10^3\div T\times$

F

=1.67 $\times\Delta A$ 测定 2 $\div\Delta A$ 标准 $\div Cpr\times F$

cNOS 活性(U/mg prot)= 总 NOS 活性-iNOS 活性

2、按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmolNO 定义为一个酶活单位。

总 NOS 活性(U/g 质量)= (ΔA 测定 1 $\div\Delta A$ 标准 $\times C$ 标准) $\times V$ 样 $\div$ (W $\times V$ 样 $\div V$ 样总) $\times 10^3\div$

T $\times F$

=1.67 $\times\Delta A$ 测定 2 $\div\Delta A$ 标准 $\div W\times F$

iNOS 活性(U/g 质量)= (ΔA 测定 2 $\div\Delta A$ 标准 $\times C$ 标准) $\times V$ 样 $\div$ (W $\times V$ 样 $\div V$ 样总) $\times 10^3\div T\times$

F

=1.67 $\times\Delta A$ 测定 2 $\div\Delta A$ 标准 $\div W\times F$

cNOS 活性(U/mg prot)= 总 NOS 活性-iNOS 活性

3、按细胞数量计算：

单位的定义：每 10⁶个细菌/细胞每分钟催化产生 1nmolNO 定义为一个酶活单位。

总 NOS 活性(U/10⁶ cell)= (ΔA 测定 1÷ΔA 标准×C 标准) ×V 样÷(N×V 样÷V 样总)×10³÷T×F

=1.67×ΔA 测定 1÷ΔA 标准÷N×F

iNOS 活性(U/10⁶ cell)= (ΔA 测定 2÷ΔA 标准×C 标准) ×V 样÷(N×V 样÷V 样总)×10³÷T×F

=1.67×ΔA 测定 2÷ΔA 标准÷N×F

cNOS 活性(U/mg prot)= 总 NOS 活性-iNOS 活性

4、按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1nmolNO 定义为一个酶活单位。

总 NOS 活性(U/mL)= (ΔA 测定 1÷ΔA 标准×C 标准) ×V 样÷V 样×10³÷T×F

=1.67×ΔA 测定 1÷ΔA 标准×F

iNOS 活性(U/mL)= (ΔA 测定 2÷ΔA 标准×C 标准) ×V 样÷V 样×10³÷T×F

=1.67×ΔA 测定 2÷ΔA 标准×F

cNOS 活性(U/mg prot)= 总 NOS 活性-iNOS 活性

V 样总：加入提取液总体积，1 mL；

V 样：0.06mL；

W：样本质量，g；

N: 细胞或细菌数目, 以 10^6 计;

Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; ;

T: 反应时间, 60min;

F: 样本稀释倍数;

10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol}=10^3\text{nmol}$;

C 标准: 标准品浓度, $0.1\mu\text{mol/mL}$;

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。