

# 一氧化氮合成酶分型试剂盒

规 格：100 管/48 样

检测原理：微量法

编 号： ml301001

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<sup>+</sup>，NO 在水溶液中极易氧化生成 NO<sup>2-</sup>和 NO<sup>3-</sup>。在酸性条件下，NO<sup>2-</sup>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 100mL×1 | -20℃，保存   |                   |
| 提取液二 | 液体 1mL×3   | -20℃，密封保存 |                   |
| 缓冲液  | 液体 20mL×1  | 2-8℃，保存   |                   |
| 试剂一  | 粉剂×1       | 2-8℃，避光保存 | 临用前加入 15mL 缓冲液溶解  |
| 试剂二  | 液体 1.5mL×1 | -20℃，避光保存 |                   |
| 试剂三  | 粉剂×1       | -20℃，避光保存 | 临用前加 1mL 缓冲液溶解    |
| 试剂四  | 粉剂×1       | -20℃，避光保存 | 临用前加 1mL 缓冲液溶解    |
| 试剂五  | 液体×1       | 2-8℃，避光保存 | 如有析出，可适当加热溶解      |
| 试剂六  | 液体×1       | 2-8℃，避光保存 | 用之前 60℃加热震荡 15min |
| 标准品  | 液体         | 2-8℃，避光保存 | 10μmol/mL 亚硝酸钠    |

## 注 意：

- 1、提取液二：为易挥发试剂，用后尽快密封；
- 2、工作液配置为试剂一：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、显色液：临用前按照试剂五：试剂六 1：1 充分混匀，现用现配；
- 4、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)                                                                 | 测定管 | 空白管(只做一管) | 标准管(只做一管) |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|-----------|
| 样本                                                                      | 60  |           |           |
| 工作液                                                                     | 140 |           |           |
| 混匀, 37℃反应 60min, 沸水浴 5min (缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后 4℃, 11000×g 离心 10min, 取上清待测 |     |           |           |

3、在 96 孔板中加入下列试剂:

|                                                                                                                                 |     |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 上清液                                                                                                                             | 100 |     |     |
| 标准液                                                                                                                             |     |     | 30  |
| 蒸馏水                                                                                                                             |     |     | 70  |
| 显色液                                                                                                                             | 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、A 标准和 A 空白, 计算 $\Delta A$<br>测定=A 测定-A 空白, $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准管只需测 1-2 次。 |     |     |     |

### 注意事项:

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  $\Delta A$  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℃反应时间后再进行测定;

3、如果  $\Delta A$  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。

$$\text{总 NOS 活性(U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr} \times F$$

$$\text{iNOS 活性(U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr} \times F$$

$$\text{cNOS 活性(U/mg prot)} = \text{总 NOS 活性} - \text{iNOS 活性}$$

### 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。

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

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F$$

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

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

$$\text{cNOS 活性(U/mg prot)} = \text{总 NOS 活性} - \text{iNOS 活性}$$

### 3、按细胞数量计算：

单位的定义：每 10<sup>6</sup>个细菌/细胞每分钟催化产生 1nmolNO 定义为一个酶活单位。

$$\text{总 NOS 活性(U/10}^6 \text{ cell)} = (\Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \times 10$$

$$^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \div N \times F$$

$$\text{iNOS 活性(U/10}^6 \text{ cell)} = (\Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \times 10^3 \div$$

$$T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准} \div N \times F$$

$$\text{cNOS 活性(U/mg prot)} = \text{总 NOS 活性} - \text{iNOS 活性}$$

#### 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。

$$\text{总 NOS 活性(U/mL)} = (\Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 1 \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

$$\text{iNOS 活性(U/mL)} = (\Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 } 2 \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

$$\text{cNOS 活性(U/mg prot)} = \text{总 NOS 活性} - \text{iNOS 活性}$$

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。