

一氧化氮合成酶（NOS）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC5680

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	-20℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
缓冲液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 50 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂六	液体 2.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 55 μL×1 支	2-8℃保存
显色液 A 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液 B 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 提取液二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
2. 试剂二：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前取 1 瓶加入 6mL 缓冲液，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融；
3. 试剂三工作液：临用前根据样本量按试剂三：缓冲液=4μL：396μL（400μL，5T）的比例配制，现用现配；
4. 试剂四：临用前取 1 支试剂四加入 0.6mL 缓冲液，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融；
5. 试剂五：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前取 1 支试剂五加入 2.4mL 缓冲液，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融；
6. 工作液：临用前根据样本数量按照试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂四：试剂五=0.6mL：1.0mL：0.4mL：0.1mL：0.4mL（2.5mL，5T）的比例配制工作液，现用现配；
7. 试剂七工作液：临用前根据样本量按试剂七：缓冲液=10μL：450μL（0.46mL，约 11T）的比例配制，现用现配；
8. 显色液：临用前根据样本数量按照显色液 A 液：显色液 B 液=1:1 充分混匀，现配现用；
9. 标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠。临用前取 5μL 10μmol/mL 亚硝酸钠标准液，加入 995μL 蒸馏水，配制成 0.05μmol/mL 亚硝酸钠标准液，现配现用。

注：试剂二、试剂四、试剂五为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同。

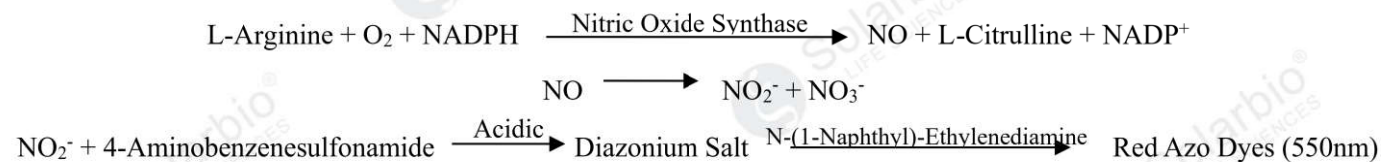
产品说明：





一氧化氮合成酶（Nitric Oxide Synthase, 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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、分析天平、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：建议称取 0.2g 样本，加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴匀浆后，于 4℃，12000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌/细胞样本：建议 1000 万细菌/细胞加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴超声破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min），然后于 4℃，12000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
3. 液体样本：直接测定。若液体有浑浊则离心取上清测定。

注：可根据样本量将提取液一和提取液二按照 0.98mL：0.02mL 的比例混匀后进行样本前处理。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
2. 在2mL EP管按下表顺序加样：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	240	-	-
工作液	500	-	-
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，取全部上清于一个新EP管中		-	-
上清液	全部上清液	-	-
试剂六	40	-	-
试剂七工作液	40	-	-
混匀，37℃反应30min		-	-
标准液	-	240	-
蒸馏水	-	580	820
显色液	400	400	400



混匀，常温静置10min，取1mL反应液于1mL玻璃比色皿中测定550nm处各管吸光值，分别记为A测定、A标准和A空白，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管和标准管只需测1-2次。

三、NOS 活性计算

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1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$\text{NOS活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (C_{pr} \times V_{样}) \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$\text{NOS活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F$$

3. 按细菌/细胞数目计算

单位的定义：每10⁶个细菌/细胞每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$\text{NOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = (\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (N \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div N \times F$$

4. 按液体体积计算

单位的定义：每mL液体每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$\text{NOS活性 (U/mL)} = (\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div V_{样} \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times F$$

C标准：0.05μmol/mL；V样：反应体系中加入的样本体积，0.24mL；V样总：加入的提取液一和提取液二的总体积，1mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数目，以10⁶计；10³：单位换算系数，1μmol=10³nmol；T：反应时间，60min；F：样本稀释倍数。

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，如果不立即进行实验，样本需-20℃保存。
2. 试剂二配制好后，建议根据样本量取出所需试剂二，剩余试剂二需尽快置于-20℃保存。
3. 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℃反应时间后再进行测定；如果 ΔA 测定大于 0.4，建议将样本匀浆后的上清液用缓冲液适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例：

1. 取0.2075g新鲜小鼠脑组织样本，加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二进行冰浴匀浆，离心后取上清，按照测定步骤操作，用1mL玻璃比色皿测得计算： $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白} = 0.062 - 0.001 = 0.061$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白} = 0.386 - 0.001 = 0.385$ ，按样本质量计算得：
 $\text{NOS活性 (U/g 质量)} = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 0.634 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取0.5×10⁶个细胞K562，加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二进行冰浴超声破碎，离心后取上清，按照测定步骤操作，用1mL玻璃比色皿测得计算： $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白} = 0.086 - 0.001 = 0.085$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白} = 0.386 - 0.001 = 0.385$ ，按样本细胞数目计算得：
 $\text{NOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div N = 0.366 \text{ U/10}^6 \text{ cell}$ 。





3. 取240 μ L马血清样本，按照测定步骤操作，用1mL玻璃比色皿测得计算： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.043 - 0.001 = 0.042$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.386 - 0.001 = 0.385$ ，按液体体积计算得：
 $\text{NOS活性 (U/mL)} = 0.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.091 \text{ U/mL}$ 。

参考文献：

- [1] List BM, Klösch B, Völker C. et al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization[J]. Biochemical Journal, 1997, 323(1): 159-165.
- [2] Dawson J, Knowles RG. A microtiter-plate assay of nitric oxide synthase activity[J]. Molecular Biotechnology, 1999, 12(3): 275-279.
- [3] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function[J]. European Heart Journal, 2012, 33(7): 829-837.

相关系列产品：

- BC0080/BC0085 硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒
- BC1470/BC1475 一氧化氮（NO）含量检测试剂盒（酶法测定总NO）
- BC5480/BC5485 一氧化氮（NO）含量检测试剂盒（化学法）
- BC5690/BC5695 一氧化氮合成酶分型（TNOS、iNOS、cNOS）活性检测试剂盒

