

一氧化氮合成酶分型 (TNOS、iNOS、cNOS) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC5690

规格: 50T/24S

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 40 mL×1 瓶	-20℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
缓冲液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5.2 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 支	-20℃保存
试剂六	液体 1.3 mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 2.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂八	液体 50 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内, 临用前取 1 瓶试剂二加入 6mL 缓冲液, -20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融;
3. 试剂三工作液: 临用前根据样本量按照试剂三: 缓冲液=8μL: 792μL (0.8mL, 10T) 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: 临用前取 1 支试剂五加入 1.2mL 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=0.8mL: 2.0mL: 0.8mL: 0.2mL (3.8mL, 10T) 的比例配制工作液, 现用现配;
7. 试剂八工作液: 临用前根据样本量按试剂八: 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。

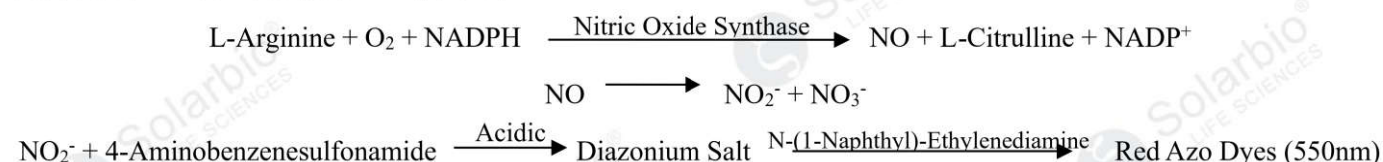




产品说明:

一氧化氮合成酶 (Nitric Oxide Synthase, NOS, EC 1.14.13.39, 此试剂盒后写为总NOS (TNOS)) 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。根据其酶活性对钙离子的依赖性不同, 分为结构型NOS (constitutive NOS, 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。

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。



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、恒温水浴锅、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°C, 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°C, 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)	总NOS测定管 (A测定1)	iNOS测定管 (A测定2)	标准管 (A标准)	空白管 (A空白)
样本	240	240	-	-
工作液	380	380	-	-
试剂五	80	-	-	-
试剂六	40	-	-	-
缓冲液	-	120	-	-
混匀, 37°C反应60min, 沸水浴5min (缠封口膜, 防止爆盖), 冷却后4°C, 11000g离心10min, 取全部上清于一个新EP管中。			-	-
上清液	全部上清液	全部上清液	-	-
试剂七	40	40	-	-
试剂八工作液	40	40	-	-



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.

混匀，37℃反应30min			-	-
标准液	-	-	240	-
蒸馏水	-	-	580	820
显色液	400	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。

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。

$$\begin{aligned} \text{(1) TNOS活性 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (C \text{pr} \times V \text{样}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{pr} \times F \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(2) iNOS活性 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (C \text{pr} \times V \text{样}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{pr} \times F \end{aligned}$$

$$\text{(3) cNOS活性 (U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{(1) TNOS活性 (U/g 质量)} &= (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div W \times F \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(2) iNOS活性 (U/g 质量)} &= (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div W \times F \end{aligned}$$

$$\text{(3) cNOS活性 (U/g 质量)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{(1) TNOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (N \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(2) iNOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (N \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F \end{aligned}$$

$$\text{(3) cNOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

4. 按液体体积计算

单位的定义：每mL液体每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$\text{(1) TNOS活性 (U/mL)} = (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div V \text{样} \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times F$$

$$\text{(2) iNOS活性 (U/mL)} = (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div V \text{样} \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times F$$

$$\text{(3) cNOS活性 (U/mL)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

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, $1\mu\text{mol}=10^3\text{nmol}$; 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, 如果不立即实验, 样本需 -20°C 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°C 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°C 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0.2047g新鲜小鼠肝脏样本, 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: $\Delta A_{\text{测定1}}=A_{\text{测定1}}-A_{\text{空白}}=0.088-0.000=0.088$, $\Delta A_{\text{测定2}}=A_{\text{测定2}}-A_{\text{空白}}=0.045-0.000=0.045$, $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}=0.380-0.000=0.380$, 按样本质量计算得:
 $\text{TNOS活性 (U/g 质量)}=0.83\times\Delta A_{\text{测定1}}\div\Delta A_{\text{标准}}\div W=0.939 \text{ U/g 质量}$
 $\text{iNOS活性 (U/g 质量)}=0.83\times\Delta A_{\text{测定2}}\div\Delta A_{\text{标准}}\div W=0.480 \text{ U/g 质量}$
 $\text{cNOS活性 (U/g 质量)}=\text{总NOS活性}-\text{iNOS活性}=0.459 \text{ U/g 质量}$
2. 取240 μL 马血清样本, 按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算: $\Delta A_{\text{测定1}}=A_{\text{测定1}}-A_{\text{空白}}=0.036-0.000=0.036$, $\Delta A_{\text{测定2}}=A_{\text{测定2}}-A_{\text{空白}}=0.021-0.000=0.021$, $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}=0.380-0.000=0.380$, 按液体体积计算得:
 $\text{TNOS活性 (U/mL)}=0.83\times\Delta A_{\text{测定1}}\div\Delta A_{\text{标准}}=0.079 \text{ U/mL}$
 $\text{iNOS活性 (U/mL)}=0.83\times\Delta A_{\text{测定2}}\div\Delta A_{\text{标准}}=0.046 \text{ U/mL}$
 $\text{cNOS活性 (U/mL)}=\text{总NOS活性}-\text{iNOS活性}=0.033 \text{ U/mL}$

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.
- [4] Kazakov A, Hall R, Jagoda P. et al. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase induces and enhances myocardial fibrosis [J]. Cardiovascular Research, 2013, 100(2):211-221.

相关系列产品:

- 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)
BC5680/BC5685 一氧化氮合成酶 (NOS) 活性检测试剂盒

