

一氧化氮合成酶分型（TNOS、iNOS、cNOS）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5695

规格：100T/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 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 2.8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 30 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂六	液体 0.6 mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 1.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂八	液体 30 μL×1 支	2-8℃保存
显色液 A 液	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液 B 液	液体 7 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照试剂三：缓冲液=2μL：198μL（0.2mL，10T）的比例配制，现用现配；
4. 试剂四：临用前加入 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=0.2mL：0.5mL：0.2mL：0.05mL（0.95mL，10T）的比例配制工作液，现用现配；
7. 试剂八工作液：临用前根据样本数量按试剂八：缓冲液=5μL：225μL（0.23mL，23T）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 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。

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/酶标仪、低温离心机、分析天平、恒温水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、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/酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，分光光度计蒸馏水调零。

2. 在1.5mL 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	60	60	-	-
工作液	95	95	-	-
试剂五	20	-	-	-
试剂六	10	-	-	-
缓冲液	-	30	-	-
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	全部上清液	-	-
试剂七	10	10	-	-



试剂八工作液	10	10	-	-
混匀，37°C反应30min				
标准液	-	-	60	-
蒸馏水	-	-	145	205
显色液	100	100	100	100
混匀，常温静置 10min，取 200μL 反应液于 96 孔板中测定 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。

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

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

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

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

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

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

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

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

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

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

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

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。

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

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

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

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

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

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。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/mL)} = (\Delta A \text{ 测定 1} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} \times 10^3 \div T \times F = 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 1} \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

$$(2) \text{ iNOS活性 (U/mL)} = (\Delta A \text{ 测定 2} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} \times 10^3 \div T \times F = 1.67 \times \Delta A \text{ 测定 2} \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

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

C标准：0.1μmol/mL；V样：反应体系中加入的样本体积，0.06mL；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 0.5, 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96孔板测得计算: $\Delta A_{\text{测定1}}=A_{\text{测定1}}-A_{\text{空白}}=0.114-0.045=0.069$, $\Delta A_{\text{测定2}}=A_{\text{测定2}}-A_{\text{空白}}=0.072-0.045=0.027$, $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}=0.550-0.045=0.505$, 按样本质量计算得:

$\text{TNOS活性 (U/g 质量)} = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.115 \text{ U/g 质量}$

$\text{iNOS活性 (U/g 质量)} = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.436 \text{ U/g 质量}$

$\text{cNOS活性 (U/g 质量)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性} = 0.679 \text{ U/g 质量}$

2. 取60 μL 马血清样本, 按照测定步骤操作, 用96孔板测得计算: $\Delta A_{\text{测定1}}=A_{\text{测定1}}-A_{\text{空白}}=0.066-0.045=0.021$, $\Delta A_{\text{测定2}}=A_{\text{测定2}}-A_{\text{空白}}=0.062-0.045=0.017$, $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}=0.550-0.045=0.505$, 按液体体积计算得:

$\text{TNOS活性 (U/mL)} = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.069 \text{ U/mL}$

$\text{iNOS活性 (U/mL)} = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.056 \text{ U/mL}$

$\text{cNOS活性 (U/mL)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性} = 0.013 \text{ U/mL}$

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

