

组织及血液一氧化氮合成酶（NOS）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA9-M96	组织及血液一氧化氮合成酶（NOS）试剂盒	96T	微量法

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与重氮盐磷酸胺生成重氮化合物，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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	-20℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×4 支	-20℃保存
缓冲液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 4 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瓶	-20℃保存
试剂六	液体 1.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 30 μL×1 支	2-8℃保存
显色液A 液	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液B 液	液体 6 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；

1. 试剂二：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前加入6mL 缓冲液，-20℃分装可保存4周，避免反复冻融；
2. 试剂三工作液：临用前根据样本量按照试剂三：缓冲液=2μL：198μL（200μL，10T）的比例配制，现用现配；
3. 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；
4. 试剂五：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前加入2.4mL 缓冲液，-20℃分装可保存4周，避免反复冻融；
5. 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=0.3mL：0.5mL：0.2mL：0.05mL：0.2mL（1.25mL，10T）的比例配制工作液，现用现配；
6. 试剂七工作液：临用前根据样本量按照试剂七：缓冲液=5μL：225μL（0.23mL，23T）的比例配制，现用现配；
7. 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；
8. 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。

操作步骤：

一、样本处理

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)	测定管	标准管	空白管
样本	60	-	-
工作液	125	-	-
混匀，37℃反应60min，沸水浴5min（扣紧盖子），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	10	-	-

试剂七工作液	10	-	-
混匀, 37°C反应30min			
标准液	-	60	-
蒸馏水	-	145	205
显色液	100	100	100

混匀, 常温静置10min, 取200 μ L反应液于96孔板中测定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。

NOS活性 (U/mg prot) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (C_{pr} \times V_{样}) \times 10^3 \div T \times F = 1.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$

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。

NOS活性 (U/g 质量) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F$
 $= 1.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F$

3. 按细菌/细胞数目计算

单位的定义: 每 10^6 个细菌/细胞每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

NOS活性 (U/ 10^6 cell) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (N \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F = 1.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div N \times F$

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。

NOS活性 (U/mL) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div V_{样} \times 10^3 \div T \times F = 1.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times F$

C标准: 0.1 μ mol/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 10^6 计; 10^3 : 单位换算系数, 1 μ mol= 10^3 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。