

# 一氧化氮合成酶 (NOS) (分型) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A014-1 可测 TNOS、iNOS、cNOS 比色法)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂	组分	50 管/24 样 A014-1-1	100 管/48 样 A014-1-2	保存条件
试剂一	底物缓冲液	6mL×2 瓶	6mL×4 瓶	-20℃ 避光
试剂二	促进剂	粉剂×3 支	粉剂×6 支	-20℃
		稀释液 0.6 mL×3 支	稀释液 0.6 mL×6 支	-20℃
试剂二	(粉剂量较少,可能附着于管壁或盖子上,并非空管,如使用时肉眼不可见,可将其 4000 转/分钟离心 2 分钟后使用), 测试前取稀释液一支 0.6mL 加入一支粉剂中充分混匀, 测试后剩余试剂可放入-20℃ 以下冷冻保存, 时间不超过一周。若发现粉剂变成黄褐色或咖啡色, 则不可再用。			
试剂三	显色剂	6mL×1 瓶	6mL×2 瓶	4℃ 避光
试剂四	透明剂	6mL×1 瓶	6mL×2 瓶	室温
天冷后会凝固, 37℃ 水浴变澄清时再使用。				
试剂五	终止剂	60mL×2 瓶	60mL×4 瓶	4℃
从冰箱取出时可能会出现浑浊, 37℃ 加热至透明再用。				
试剂六	抑制剂	10mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
	用前请仔细观察, 如有结晶附着在瓶壁或瓶底, 可将试剂连同瓶子一起在 90~100℃ 热水中摇晃等其完全溶解, 冷却至室温后即可使用。			

**注:** -20℃ 保存的试剂, 如需多次使用, 请在第一次解冻时, 尽快分装好多余的保存起来, 每次用多少取出多少解冻后用。

## 二、所需仪器耗材及试剂:

含 530nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、37℃ 恒温水浴锅或气浴箱、电炉(配试剂加热用)、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS(0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 三、操作步骤: (注: 试剂从冰箱取出, 室温稳定 30 分钟再用, 试剂四和试剂五必须澄清透亮, 再进行操作, 否则会影响结果)

### 1、样本前处理:

①、**组织样本:** 准确称取待测组织的重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质(推荐 0.9% 的生理盐水或 0.1mol/L 且 pH 值为 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液), 冰水浴条件机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液(10% 匀浆上清)待测。(注: 匀浆上清需测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)

②、**血清(浆)样本:** 直接使用。

### 2、操作表:

	TNOS 空白管	TNOS 测定管	iNOS 空白管	iNOS 测定管
双蒸水(μL)	a*+100	100	a*	
样本(μL)		a*		a*
试剂六(μL)			100	100
摇动一下试管架				
试剂一(μL)	200	200	200	200
试剂二(μL)	10	10	10	10
试剂三(μL)	100	100	100	100
试剂四(μL)	100	100	100	100
试剂五(μL)	2000	2000	2000	2000
混匀, 530nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值				

[注]: 1、a\*为参考取样量及补足双蒸水的量, 10%的大鼠肝组

织 50~100μL, 鼠血清 30μL, 10%的大鼠肾匀浆 50μL, 狗血清 30μL, 心肌培养液 100μL。

2、比色时注意管内有无结晶或混浊, 若有, 可放 37℃ 水浴锅内轻轻搅动几下, 混浊或结晶消失后再比色。

## 四、计算与举例:

### (一)、血清 NOS 酶活力计算:

1、**单位定义:** 每毫升血清每分钟催化生成 1nmol NO 为一个酶活力单位。

### 2、计算公式:

$$\text{TNOS 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{TNOS测定}} - A_{\text{TNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div 1000$$

$$\text{iNOS 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{iNOS测定}} - A_{\text{iNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div 1000$$

$V_{\text{反应}}$ : 反应液总体积, (a+2.51)mL;

$V_{\text{样}}$ : 取样量, (a)mL;

$d$ : 比色光径, cm;

$T$ : 反应时间, 15min;

$\epsilon$ : 呈色物消光摩尔系数,  $38.3 \times 10^{-6}$ 。

### (二)、组织 NOS 酶活力计算:

1、**单位定义:** 每毫克组织蛋白每分钟催化生成 1nmol NO 为一个酶活力单位。

### 2、计算公式:

$$\text{TNOS 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{TNOS测定}} - A_{\text{TNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div \text{Cpr}$$

$$\text{iNOS 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{iNOS测定}} - A_{\text{iNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{反应}}$ : 反应液总体积, (a+2.51)mL;

$V_{\text{样}}$ : 取样量, (a)mL;

$d$ : 比色光径, cm;

$T$ : 反应时间, 15min;

$\epsilon$ : 呈色物消光摩尔系数,  $38.3 \times 10^{-6}$ ;

$\text{Cpr}$ : 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/L (prot 指蛋白)。

## 五、测定原理:

NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物, 在 530nm 波长下测定吸光度, 根据吸光度的大小可计算出 NOS 活力。

NOS 主要有两种类型: 即结构型(cNOS)和诱导型(iNOS)。结构型(cNOS)主要存在于神经元和内皮细胞内, 依赖钙; 诱导型(iNOS)主要存在于巨噬细胞内, 不依赖钙。根据此原理可以分型。

## 六、正常参考值:

大鼠血清 (TNOS): 18.69±3.97 U/mL (n=45)

大鼠肾匀浆 (TNOS): 0.536±0.134 U/mgprot (n=19)

狗血清 (TNOS): 20.57±3.39 U/mL (n=18)

心肌培养液 (TNOS): 0.698±0.110U/mL (n=12)

## 七、注意点:

1、促进剂最好现用现配, 配好后尽量一日内用完, 如有剩余则 -20℃ 以下保存不超过一周; 未配制之前的试剂二促进剂和稀释液均应 -20℃ 以下保存, 如淡黄色或白色粉末变成咖啡色或黄褐色颗粒则失效不可用。

2、试剂六为过饱和溶液, 一次实验用不完再用时可能有结晶, 用之前可以再次边沸水浴边用玻璃棒搅拌使其溶解。

3、NOS 活性低, 稳定性差, 样品或匀浆上清如不马上检测, 应置 -20℃ 以下冷冻保存。

4、试剂一与配制好的试剂二应尽量避免反复冻融。

5、室温低时, NOS 试剂五会出现浑浊, 如果已经在测试管

中加入了 NOS 试剂五, 可将测试管对着灯光, 观察有无结晶或浑浊。如果有结晶或浑浊, 请将每只测试管放到 37℃ 水浴锅中晃动 5 分钟, 再比色。

6、检测范围: 0.2-81.9U/mL。