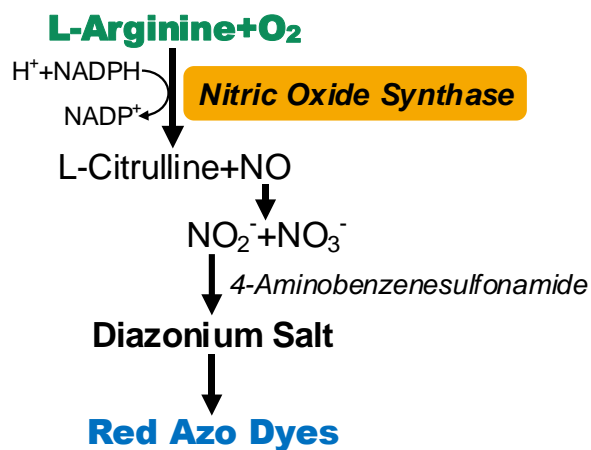




一氧化氮合成酶分型 (TNOS、iNOS、cNOS) 活性检测试剂盒
Nitric Oxide Synthase (NOS) Activity Typed Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



一氧化氮合成酶分型 (TNOS、iNOS、cNOS) 活性检测试剂盒

Nitric Oxide Synthase (NOS) Activity Typed Assay Kit

一、产品描述

一氧化氮合成酶是生物体内催化 L-精氨酸合成一氧化氮的一种酶，广泛存在于血管平滑肌、巨噬细胞等细胞中，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。根据其酶活性对钙离子的依赖性不同，分为结构型 NOS (cNOS) 和损伤诱导型 NOS (iNOS)。

一氧化氮合成酶能够催化 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 550 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征一氧化氮合成酶的活性。

二、产品内容

| 名称 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用说明及注意事项 |
|-------|---------------|-------------|--|
| 提取液 A | 液体 60 mL×1 瓶 | -20°C 保存 | - |
| 提取液 B | 液体 0.6 mL×2 支 | -20°C 保存 | - |
| 试剂一 | 液体 2.8 mL×1 瓶 | 4°C 保存 | - |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | -20°C 保存 | 使用前加入 6 mL 试剂九充分溶解 (分装-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融) |
| 试剂三 | 液体 30 μL×1 支 | 4°C 保存 | - |
| 试剂四 | 粉剂×1 支 | -20°C 保存 | 使用前加入 600 μL 试剂九充分溶解 (分装-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融) |
| 试剂五 | 粉剂×1 支 | -20°C 保存 | 使用前加入 1.2 mL 试剂九充分溶解 (分装-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融) |
| 试剂六 | 液体 0.6 mL×1 支 | 4°C 保存 | - |
| 试剂七 | 液体 1.5 mL×1 瓶 | 4°C 保存 | - |
| 试剂八 | 液体 30 μL×1 支 | 4°C 保存 | - |
| 试剂九 | 液体 20 mL×1 瓶 | 4°C 保存 | - |
| 显色液 | 组分 A | 液体 7 mL×1 瓶 | 按照组分 A:组分 B=1:1 的体积比配制 (充分混匀即为显色液，根据使用量现用现配) |
| | 组分 B | 液体 7 mL×1 瓶 | |
| 标准液 | 液体 1 mL×1 支 | 4°C 保存 | 10 μmol/mL 亚硝酸钠 |

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：称取 0.2 g 组织，加入 980 μL 提取液 A 和 20 μL 提取液 B，冰浴匀浆，4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 10 min，取上清液即为**粗酶液**，置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集 1000 万细菌或细胞至离心管内，加入 980 μL 提取液 A 和 20 μL 提取液 B，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min），4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 10 min，取上清液即为**粗酶液**，置于冰上待测。

③培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测，若浑浊应适当离心取上清测定。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 550 nm，蒸馏水调零。

②**试剂三工作液的配制（现用现配）：**根据使用量按试剂三：试剂九=1:99 的体积比配制；

③**试剂八工作液的配制（现用现配）：**根据使用量按试剂八：试剂九=1:45 的体积比配制；

④**检测工作液的配制（现用现配）：**根据使用量按试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂四=4:10:4:1 的体积比配制；

⑤**标准应用液的制备（现用现配）：**使用前将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 亚硝酸钠使用蒸馏水稀释至 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ，充分混匀即为标准应用液。

⑥**标准应用液的测定：**在离心管中依次加入下列试剂

| 试剂 | 标准管 (μL) | 空白管 (μL) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 标准应用液 | 60 | - |
| 蒸馏水 | 145 | 205 |
| 显色液 | 100 | 100 |
| 充分混匀，室温静置 10 min | | |

吸光值测定：吸取 200 μL 反应液至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 550 nm 处吸光值，记为 A 标准和 A 空白；计算 ΔA 标准=A 标准-空白。注：标准管和空白管只需测定 1-2 次。

⑦TNOS 和 iNOS 的测定：在离心管中依次加入下列试剂

| 试剂 | 测定管 1 (μL) | 测定管 2 (μL) |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| 粗酶液 | 60 | 60 |
| 检测工作液 | 95 | 95 |
| 试剂五 | 20 | - |
| 试剂六 | 10 | - |
| 试剂九 | - | 30 |

①充分混匀，37°C反应 60 min

②立即沸水浴处理 5 min，冷却至室温

③4°C 12000 g 离心 10 min，取全部上清液

| 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 |

充分混匀，37°C反应 30 min

| | | |
|-----|-----|-----|
| 显色液 | 100 | 100 |
|-----|-----|-----|

充分混匀，室温静置 10 min

注：沸水浴处理过程中注意密封以防止水分散失

吸光值测定：吸取 200 μL 反应液至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 550 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A2 测定；计算 $\Delta\text{A1 测定} = \text{A1 测定} - \text{A 空白}$ ， $\Delta\text{A2 测定} = \text{A2 测定} - \text{A 空白}$ 。

3. 一氧化氮合成酶 (NOS) 活性计算

3.1 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NO 定义为一个酶活力单位。

$$\textcircled{1} \text{TNOS (U/mg prot)} = \frac{\text{C 标} \times \Delta\text{A1 测定} \times 10^3}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标准} \times \text{T}} = \frac{1.67 \times \Delta\text{A1 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标准}}$$

$$\textcircled{2} \text{iNOS (U/mg prot)} = \frac{\text{C 标} \times \Delta\text{A2 测定} \times 10^3}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标准} \times \text{T}} = \frac{1.67 \times \Delta\text{A2 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标准}}$$

$$\textcircled{3} \text{cNOS (U/mg prot)} = \text{TNOS} - \text{iNOS}$$

3.2 按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NO 定义为一个酶活力单位。

$$\textcircled{1} \text{TNOS (U/g)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A1 \text{ 测定} \times V \text{ 样总} \times 10^3}{W \times \Delta A \text{ 标准} \times T} = \frac{1.67 \times \Delta A1 \text{ 测定}}{W \times \Delta A \text{ 标准}}$$

$$\textcircled{2} \text{iNOS (U/g)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A2 \text{ 测定} \times V \text{ 样总} \times 10^3}{W \times \Delta A \text{ 标准} \times T} = \frac{1.67 \times \Delta A2 \text{ 测定}}{W \times \Delta A \text{ 标准}}$$

$$\textcircled{3} \text{cNOS (U/g)} = \text{TNOS} - \text{iNOS}$$

3.3 按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NO 定义为一个酶活力单位。

$$\textcircled{1} \text{TNOS (U/}10^4 \text{ cell)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A1 \text{ 测定} \times V \text{ 样总} \times 10^3}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准} \times T} = \frac{1.67 \times \Delta A1 \text{ 测定}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

$$\textcircled{2} \text{iNOS (U/}10^4 \text{ cell)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A2 \text{ 测定} \times V \text{ 样总} \times 10^3}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准} \times T} = \frac{1.67 \times \Delta A2 \text{ 测定}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

$$\textcircled{3} \text{cNOS (U/}10^4 \text{ cell)} = \text{TNOS} - \text{iNOS}$$

3.4 按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟生成 1 nmol NO 定义为一个酶活单位。

$$\textcircled{1} \text{TNOS (U/mL)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A1 \text{ 测定} \times 10^3}{\Delta A \text{ 标准} \times T} = \frac{1.67 \times \Delta A1 \text{ 测定}}{\Delta A \text{ 标准}}$$

$$\textcircled{2} \text{iNOS (U/mL)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A2 \text{ 测定} \times 10^3}{\Delta A \text{ 标准} \times T} = \frac{1.67 \times \Delta A2 \text{ 测定}}{\Delta A \text{ 标准}}$$

$$\textcircled{3} \text{cNOS (U/mL)} = \text{TNOS} - \text{iNOS}$$

注释： C 标：标准应用液浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；W：样本质量，g；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，60 min； 10^3 ：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=10^3 \text{ nmol}$ ；TNOS：总一氧化氮合成酶；iNOS：损伤诱导型一氧化氮合成酶；cNOS：结构型一氧化氮合成酶。

四、注意事项

- ①一氧化氮合成酶易变性失活，建议使用新鲜样本进行检测，粗酶液制备后应当天完成检测；
- ②试剂二配制好后，建议根据使用量取用所需试剂二，剩余试剂应尽快置于 -20°C 保存；

③若 ΔA 测定大于 0.4，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间（第一步 37°C 反应时间）或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

