

一氧化氮合成酶分型(TNOS、iNOS、cNOS)活性检测试剂盒 (微量法)

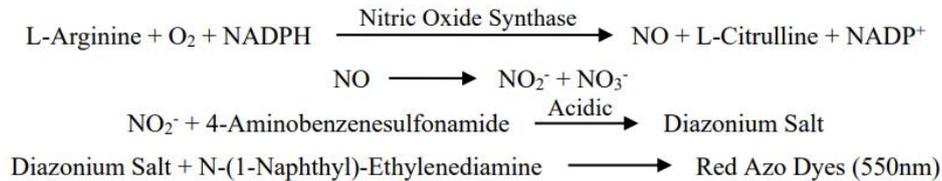
产品货号: BA2257

产品规格: 100T/48S

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⁻与重氮盐磺酰胺生成重氮化合物, 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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体60mL×1瓶	-20℃
提取液二	液体0.6mL×1瓶	-20℃
缓冲液	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体2.8mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体30μL×1支	2-8℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃
试剂六	液体0.6mL×1支	2-8℃
试剂七	液体1.5mL×1瓶	2-8℃
试剂八	液体30 μ L×1支	2-8℃
显色液A液	液体7mL×1瓶	2-8℃
显色液B液	液体7mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

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;



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

3. 试剂三工作液：临用前根据样本量按照试剂三：缓冲液=2 μL：198 μL（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照试剂八：缓冲液=5 μL：225 μL（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：10 μmol/mL亚硝酸钠。临用前取10 μL 10 μmol/mL亚硝酸钠标准液，加入990 μL蒸馏水，配制成0.1 μmol/mL亚硝酸钠标准液，现配现用。

自备材料：

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。

测定步骤：

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（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	全部上清液	-	-
试剂七	10	10	-	-
试剂八工作液	10	10	-	-
混匀，37℃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200 μL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				



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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. 按细胞/细菌数目计算

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。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/}10^6 \text{ cell)} = (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (N \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ = 1.67 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F$$

$$(2) \text{ iNOS活性 (U/}10^6 \text{ cell)} = (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (N \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ = 1.67 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F$$

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

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: 0.1 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com