

## 一氧化氮合成酶（NOS）活性检测试剂盒（微量法）

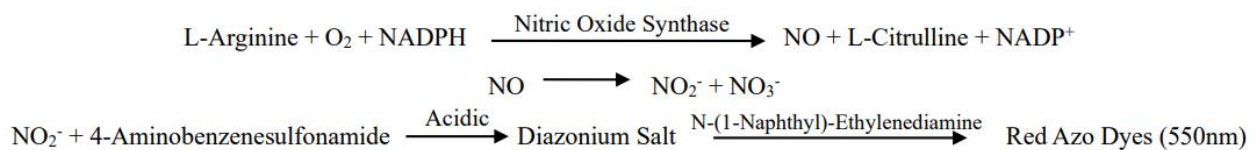
产品货号：BA2255

产品规格：100T/96S

### 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<sup>+</sup>，NO在水溶液中极易氧化生成NO<sub>2</sub><sup>-</sup>和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>。在酸性条件下，NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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。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110mL×1瓶	-20℃
提取液二	液体0.6mL×1瓶	-20℃
缓冲液	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体4mL×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瓶	-20℃
试剂六	液体1.5mL×1支	2-8℃
试剂七	液体30 μ L×1支	2-8℃
显色液A液	液体6mL×1瓶	2-8℃
显色液B液	液体6mL×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；
3. 试剂三工作液：临用前根据样本量按照试剂三：缓冲液=2 μ L：198 μ L（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：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；
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：试剂五=0.3mL：0.5mL：0.2mL：



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

0.05mL: 0.2mL (1.25mL, 10T) 的比例配制工作液, 现用现配;

- 试剂七工作液: 临用前根据样本数量按照试剂七: 缓冲液=5 μL: 225 μL (0.23mL, 23T) 的比例配制, 现用现配;
- 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;
- 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、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)

- 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°C, 12000g, 离心 15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
- 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°C, 12000g, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
- 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

- 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。
- 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°C反应60min, 沸水浴5min (扣紧盖子), 冷却后4°C, 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 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、A标准和A空白, 计算 ΔA测定=A测定-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。

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

$$= 1.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$



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

## 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。

$$\begin{aligned}\text{NOS活性 (U/g 质量)} &= (\Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{C标准}) \times \text{V样} \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \times 10^3 \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 1.67 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \div \text{W} \times \text{F}\end{aligned}$$

## 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。

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

## 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。

$$\begin{aligned}\text{NOS活性 (U/mL)} &= (\Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{C标准}) \times \text{V样} \div \text{V样} \times 10^3 \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 1.67 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{F}\end{aligned}$$

C标准：0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；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 $\mu\text{mol}$ = $10^3\text{nmol}$ ；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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
3. 如果 $\Delta\text{A}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 反应时间后再进行测定；如果 $\Delta\text{A}$ 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