

一氧化氮合成酶(INOS)活性分型试剂盒

规格：100管/48样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14877

检测波长：550nm

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

一氧化氮合成酶 (NitricOxideSynthase, 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。

根据其酶活性对钙离子的依赖性不同，分为结构型NOS (constitutiveNOS, 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。

测定原理

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。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液一	液体100mL×1	-20℃，保存	

提取液二	液体1mL×3	-20℃, 密封保存	
缓冲液	液体20mL×1	2-8℃, 保存	
试剂一	粉剂×1	2-8℃, 避光保存	临用前加入15mL缓冲液溶解
试剂二	液体1.5mL×1	-20℃, 避光保存	
试剂三	粉剂×1	-20℃, 避光保存	临用前加1mL缓冲液溶解
试剂四	粉剂×1	-20℃, 避光保存	临用前加1mL缓冲液溶解
试剂五	液体×1	2-8℃, 避光保存	如有析出, 可适当加热溶解
试剂六	液体×1	2-8℃, 避光保存	用之前60℃加热震荡15min
标准品	液体	2-8℃, 避光保存	10μmol/mL亚硝酸钠

注意:

- 1、提取液二：为易挥发试剂，用后尽快密封；
- 2、工作液A配置为试剂一：试剂二：试剂三：试剂四按照12.5mL：1.5mL：1mL：0.07mL的比例混合，-20℃保存1周；
- 3、工作液B配置为试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂七按照12.2mL：1.5mL：1mL：0.07mL：0.3mL的比例混合，-20℃保存1周；
- 4、显色液：临用前按照试剂五：试剂六1：1充分混匀，现用现配；
- 5、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。

样品提取**一、组织样本的处理：**

称取0.2g组织样本加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二，冰浴匀浆后，12000g，4℃离心15min，取上清至冰上待测；

二、细胞样本处理：

取约1000万细菌或细胞加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二，超声波破碎(冰浴，功率200W，超声3s，间隔10s，重复30次)，12000g，4℃离心15min，取上清至冰上待测；

三、液体样本处理：

澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测；

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，设置温度在37℃，调节波长至550nm。
- 2、在EP管中加入下列试剂：

试剂 (μL)	测定管	空白管(只做一管)	标准管(只做一管)
---------	-----	-----------	-----------

样本	60		
工作液	140		
混匀，37℃反应60min，沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖），冷却后4℃，11000×g离心10min，取上清待测			

3. 在96孔板中加入下列试剂：

上清液	100		
标准液			30
蒸馏水			70
显色液	100	100	100
混匀，常温静置10min，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。			

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℃保存。
- 2、如果 $\Delta A_{测定}$ 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℃反应时间后再进行测定；
- 3、如果 $\Delta A_{测定}$ 大于0.5，建议将样本匀浆后的上清液用提取液一适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

结果计算：

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1nmolNO定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{总NOS活性(U/mg prot)} &= (\Delta A_{测定1} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (C_{pr} \times V_{样}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 1.67 \times \Delta A_{测定1} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{iNOS活性(U/mg prot)} &= (\Delta A_{测定2} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (C_{pr} \times V_{样}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 1.67 \times \Delta A_{测定2} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F \end{aligned}$$

$$\text{cNOS活性(U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

2、按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmolNO定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{总NOS活性(U/g 质量)} &= (\Delta A_{测定1} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F \\ &= 1.67 \times \Delta A_{测定1} \div \Delta A_{标准} \div W \times F \end{aligned}$$

$$\text{iNOS活性(U/g 质量)} = (\Delta A_{测定2} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

$$\text{cNOS活性(U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

3、按细胞数量计算：

单位的定义：每 10^6 个细菌/细胞每分钟催化产生1nmolNO定义为一个酶活单位。

$$\text{总NOS活性(U/10}^6 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 10^3 \div T \times$$

F

$$= 1.67 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

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

$$= 1.67 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

$$\text{cNOS活性(U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

4、按液体体积计算：

单位的定义：每mL液体每分钟催化产生1nmolNO定义为一个酶活单位。

$$\text{总NOS活性(U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

$$\text{iNOS活性(U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 1.67 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

$$\text{cNOS活性(U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

V样总：加入提取液总体积，1 mL；

V样：0.06mL；

W：样本质量，g；

N：细胞或细菌数目，以 10^6 计；

Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；

T：反应时间，60min；

F：样本稀释倍数；

10^3 ：单位换算系数， $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ ；

C标准：标准品浓度， $0.1\mu\text{mol/mL}$ ；

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3-5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。