

一氧化氮合成酶分型(TNOS、iNOS、cNOS)活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

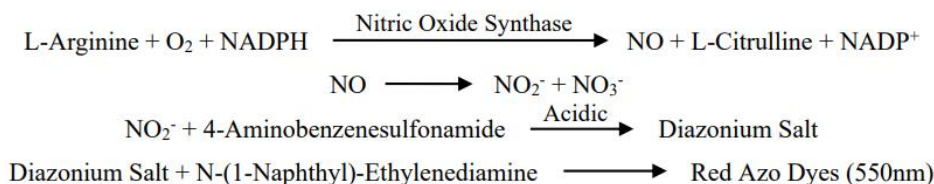
产品货号: BA2256

产品规格: 50T/24S

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40mL×1瓶 | -20℃ |
| 提取液二 | 液体0.6mL×1瓶 | -20℃ |
| 缓冲液 | 液体30mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂一 | 液体5.2mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 粉剂×2瓶 | -20℃ |
| 试剂三 | 液体50μL×1支 | 2-8℃ |
| 试剂四 | 粉剂×2支 | -20℃ |
| 试剂五 | 粉剂×2支 | -20℃ |
| 试剂六 | 液体1.3mL×1支 | 2-8℃ |
| 试剂七 | 液体2.5mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂八 | 液体50 μ L×1支 | 2-8℃ |
| 显色液A液 | 液体15mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 显色液B液 | 液体15mL×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,临用前取1瓶试剂二加入6mL缓冲液,-20℃分装保存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=8 μ L: 792 μ L(0.8mL, 10T)的比例配制,现用现配;



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 试剂四：临用前取1支试剂四加入0.6mL缓冲液，-20℃分装可保存4周，避免反复冻融；
- 试剂五：临用前取1支试剂五加入1.2mL缓冲液，-20℃分装可保存4周，避免反复冻融；
- 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=0.8mL：2.0mL：0.8mL：0.2mL（3.8mL，10T）的比例配制工作液，现用现配；
- 试剂八工作液：临用前根据样本数量按照试剂八：缓冲液=10 μL：450 μL（0.46mL，约11T）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5 μL 10 μmol/mL亚硝酸钠标准液，加入995 μL蒸馏水，配制成0.05 μmol/mL亚硝酸钠标准液，现配现用。

注：试剂二、试剂四、试剂五为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同。

自备材料：

可见分光光度计、低温离心机、分析天平、恒温水浴锅、1mL玻璃比色皿、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℃，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℃，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

- 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
- 在2mL 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 | 240 | 240 | - | - |
| 工作液 | 380 | 380 | - | - |
| 试剂五 | 80 | - | - | - |
| 试剂六 | 40 | - | - | - |
| 缓冲液 | - | 120 | - | - |
| 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 | 40 | 40 | - | - |
| 试剂八工作液 | 40 | 40 | - | - |
| 混匀，37℃反应30min | | | | |
| 标准液 | - | - | 240 | - |
| 蒸馏水 | - | - | 580 | 820 |
| 显色液 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| 混匀，常温静置10min，取1mL反应液于1mL玻璃比色皿中测定550nm处各管吸光值，分别记为A测定1、A测定2、A标准和A空白，计算 $\Delta A_{测定1}=A_{测定1}-A_{空白}$ ， $\Delta A_{测定2}=A_{测定2}-A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$ 。空白管和标 | | | | |



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

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

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

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。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

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

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/g 质量)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

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。

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

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

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

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

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

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。

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

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定1}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

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

$$= 0.83 \times \Delta A_{\text{测定2}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/mL)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

C标准：0.05 μ mol/mL；V样：反应体系中加入的样本体积，0.24mL；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 $^{\circ}$ 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0.4，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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com