

# 一氧化氮合成酶（NOS）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC17813

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	-20℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×4 支	-20℃保存
缓冲液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 30 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂六	液体 1.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 30 μL×1 支	2-8℃保存
显色液 A 液	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液 B 液	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

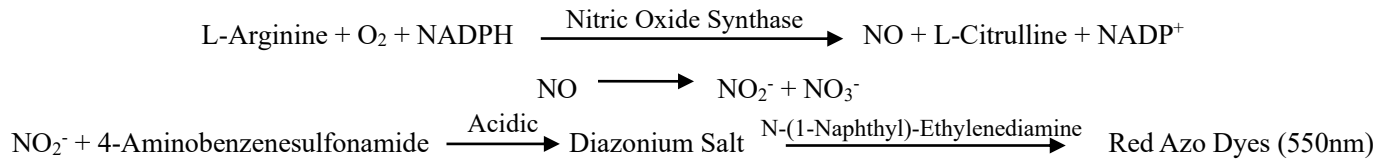
溶液的配制：

1. 提取液二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
1. 试剂二：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前加入 6mL 缓冲液，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融；
2. 试剂三工作液：临用前根据样本量按照试剂三：缓冲液=2μL：198μL（200μL，10T）的比例配制，现用现配；
3. 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；
4. 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；
5. 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：0.05mL：0.2mL（1.25mL，10T）的比例配制工作液，现用现配；
6. 试剂七工作液：临用前根据样本量按照试剂七：缓冲液=5μL：225μL（0.23mL，23T）的比例配制，现用现配；
7. 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；
8. 标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠。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。

## 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。**

### 需自备的仪器和用品：

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。

### 操作步骤：

#### 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°C，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°C，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）	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200μL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。

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

#### 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。

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

#### 3. 按细菌/细胞数目计算

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。

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

#### 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。

$$\text{NOS活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times 10^3 \div T \times F = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C标准：0.1 $\mu$ 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 $\mu$ mol=10<sup>3</sup>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℃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℃保存。
3. 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；如果 $\Delta A$  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。

#### 实验实例：

1. 取0.2075g新鲜小鼠脑组织样本，加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二进行冰浴匀浆，离心后取上清，按照测定步骤操作，用96孔板测得计算： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.087 - 0.046 = 0.041$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.519 - 0.046 = 0.473$ ，按样本质量计算得：  
 $\text{NOS活性 (U/g 质量)} = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.698 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取 $0.5 \times 10^6$ 个细胞K562，加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二进行冰浴超声破碎，离心后取上清，按照测定步骤操作，用96孔板测得计算： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.099 - 0.046 = 0.053$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.519 - 0.046 = 0.473$ ，按样本细胞数目计算得：  
 $\text{NOS活性 (U}/10^6 \text{ cell)} = 1.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N = 0.374 \text{ U}/10^6 \text{ cell}$ 。
3. 取60 $\mu$ L马血清样本，按照测定步骤操作，用96孔板测得计算： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.069 - 0.046 = 0.023$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.519 - 0.046 = 0.473$ ，按液体体积计算得：

NOS活性 (U/mL) =  $1.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$  = 0.081 U/mL。

#### 参考文献:

[1] List BM, Klösch B, Völker C. et al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization[J]. Biochemical Journal, 1997, 323(1): 159-165.

[2] Dawson J, Knowles RG. A microtiter-plate assay of nitric oxide synthase activity[J]. Molecular Biotechnology, 1999, 12(3): 275-279.

[3] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function[J]. European Heart Journal, 2012, 33(7): 829-837.

#### 相关系列产品:

AC10081/AC10082 硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒

AC10317/AC10318 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (酶法测定总NO)

AC17826/AC17946 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (化学法)

AC17814/AC17815 一氧化氮合成酶分型 (TNOS、iNOS、cNOS) 活性检测试剂盒