

一氧化氮合成酶 (NOS) (分型) 测定试剂盒

(货号: BC099 可测 TNOS、iNOS、cNOS 比色法)

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂	组分	50 管/24 样 A014-1-1	100 管/48 样 A014-1-2	保存条件
试剂一	底物缓冲液	6mL×2 瓶	6mL×4 瓶	-20°C 避光
试剂二	促进剂	粉剂×3 支	粉剂×6 支	-20°C
		稀释液 0.6 mL×3 支	稀释液 0.6 mL×6 支	-20°C
	(粉剂量较少,可能附着于管壁或盖子上,并非空管,如使用时肉眼不可见,可将其 4000 转/分钟离心 2 分钟后使用), 测试前取稀释液一支 0.6mL 加入一支粉剂中充分混匀, 测试后剩余试剂可放入 -20°C 以下冷冻保存, 时间不超过一周。若发现粉剂变成黄褐色或咖啡色, 则不可再用。			
试剂三	显色剂	6mL×1 瓶	6mL×2 瓶	4°C 避光
试剂四	透明剂	6mL×1 瓶	6mL×2 瓶	室温
	天冷后会凝固, 37°C 水浴变澄清时再使用。			
试剂五	终止剂	60mL×2 瓶	60mL×4 瓶	4°C
	从冰箱取出时可能会出现浑浊, 37°C 加热至透明再用。			
试剂六	抑制剂	10mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4°C
	用前请仔细观察, 如有结晶附着在瓶壁或瓶底, 可将试剂连同瓶子一起在 90~100°C 热水中摇晃等其完全溶解, 冷却至室温后即可使用。			

注: -20°C 保存的试剂,如需多次使用,请在第一次解冻时,尽快分装好多余的保存起来,每次用多少取出多少解冻后用。

二、操作步骤: (注: 试剂从冰箱取出, 室温稳定 30 分钟再用, 试剂四和试剂五必须澄清透亮, 再进行操作, 否则会影响结果)

1、样本前处理:

- ①、组织样本: 准确称取待测组织的重量, 按重量 (g) :体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质 (推荐 0.9%的生理盐水或 0.1mol/L 且 pH 值为 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液), 冰水浴条件机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 (10%匀浆上清) 待测。(注: 匀浆上清需测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)
- ②、血清 (浆) 样本: 直接使用。

2、操作表:

	TNOS 空白管	TNOS 测定管	iNOS 空白管	iNOS 测定管
--	-------------	-------------	-------------	-------------

双蒸水(μL)	a*+100	100	a*	
样本(μL)		a*		a*
试剂六 (μL)			100	100
摇动一下试管架				
试剂一 (μL)	200	200	200	200
试剂二 (μL)	10	10	10	10
试剂三 (μL)	100	100	100	100
37°C 孵育 15min				
试剂四 (μL)	100	100	100	100
试剂五 (μL)	2000	2000	2000	2000
混匀, 530nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值				

[注]: 1、a*为参考取样量及补足双蒸水的量, 10%的大鼠肝组织 50~100μL, 鼠血清 30μL, 10%的大鼠肾匀浆 50μL, 狗血清 30μL, 心肌培养液 100μL。

2、比色时注意管内有无结晶或混浊, 若有, 可放 37°C 水浴锅内轻轻搅动几下, 混浊或结晶消失后再比色。

三、计算与举例:

(一)、血清 NOS 酶活力计算:

1、单位定义: 每毫升血清每分钟催化生成 1nmol NO 为一个酶活力单位。

2、计算公式:

$$\text{TNOS活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{TNOS测定}} - A_{\text{TNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div 1000$$

$$\text{iNOS活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{iNOS测定}} - A_{\text{iNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div 1000$$

$V_{\text{反总}}$: 反应液总体积, (a+2.51)mL;

$V_{\text{样}}$: 取样量, (a)mL;

d : 比色光径, cm;

T : 反应时间, 15min;

ϵ : 呈色物消光摩尔系数, 38.3×10^{-6} 。

3、计算举例:

取血清 30μL 按操作表进行检测, 测得 TNOS 空白管吸光度为 0.024, TNOS 测定管吸光度为 0.273, iNOS 空白管吸光度为 0.010, iNOS 测定管吸光度为 0.149。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{TNOS活力 (U/mL)} &= \frac{0.273 - 0.024}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + 0.03}{0.03} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 1000 \\ &= 36.696 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{iNOS活力 (U/mL)} &= \frac{0.149 - 0.010}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + 0.03}{0.03} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 1000 \\ &= 20.485 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

(二)、组织 NOS 酶活力计算:

1、单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化生成 1nmol NO 为一个酶活力单位。

2、计算公式:

$$\text{TNOS活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{TNOS测定}} - A_{\text{TNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div \text{Cpr}$$

$$\text{iNOS活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{iNOS测定}} - A_{\text{iNOS空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{d \times T} \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{反应}}$:反应液总体积,(a+2.51)mL;

$V_{\text{样}}$:取样量,(a)mL;

d :比色光径,cm;

T :反应时间,15min;

ϵ :呈色物消光摩尔系数, 38.3×10^{-6} ;

Cpr :组织匀浆蛋白浓度, mgprot/L (prot 指蛋白)。

3、计算举例:

例 1:取小鼠肝组织 0.15g 加 9 倍的生理盐水 1.35mL 制备成 10%的组织匀浆, 3000 转/分, 离心 10 分钟 (具体操作见我所的实验方法学), 取上清 50 μ L 测 NOS 活力。测得 TNOS 空白管吸光度为 0.021, TNOS 测定管吸光度为 0.159, 测得 iNOS 空白管吸光度为 0.008, iNOS 测定管吸光度为 0.054, 同时测得 10%小鼠肝匀浆蛋白浓度为 14.012mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{TNOS活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.159 - 0.021}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.56}{0.05} \times \frac{1}{1 \times 15} \div (14.012 \times 10^3) \\ &= 0.8777\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{iNOS活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.054 - 0.008}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.56}{0.05} \times \frac{1}{1 \times 15} \div (14.012 \times 10^3) \\ &= 0.2926\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

例 2:取中华鲟脑组织 0.1g 加 9 倍的生理盐水 0.9mL 制备成 10%组织匀浆, 3000 转/分, 离心 10 分钟 (具体操作见本公司的实验方法学), 取上清 50 μ L 测 NOS 活力。测得 TNOS 空白管吸光度为 0.023, TNOS 测定管吸光度为 0.122, 测得 iNOS 空白管吸光度为 0.006, iNOS 测定管吸光度为 0.058, 同时测得 10%中华鲟脑组织匀浆蛋白浓度为 4.5332mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{TNOS活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.122 - 0.023}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.56}{0.05} \times \frac{1}{1 \times 15} \div (4.5332 \times 10^3) \\ &= 1.9463\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{iNOS活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.058 - 0.006}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.56}{0.05} \times \frac{1}{1 \times 15} \div (4.5332 \times 10^3) \\ &= 1.0223\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

四、测定原理:

NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物, 在 530nm 波长下测定吸光度, 根据吸光度 的大小可计算出 NOS 活力。

NOS 主要有两种类型: 即结构型(cNOS)和诱导型(iNOS)。结构型(cNOS)主要存在于神经元和内皮细胞内, 依赖钙; 诱导型(iNOS)主要存在于巨噬细胞内, 不依赖钙。根据此原理可以分型。

五、正常参考值:

大鼠血清 (TNOS): 18.69 \pm 3.97 U/mL (n=45)

大鼠肾匀浆 (TNOS): 0.536 \pm 0.134 U/mgprot (n=19)

狗血清 (TNOS): 20.57 \pm 3.39 U/mL (n=18)

心肌培养液 (TNOS): $0.698 \pm 0.110 \text{U/mL}$ (n=12)

六、注意点:

- 1、促进剂最好现用现配，配好后尽量一日内用完，如有剩余则-20°C 以下保存不超过一周；未配制之前的试剂二促进剂和稀释液均应-20°C 以下保存，如淡黄色或白色粉末变成咖啡色或黄褐色颗粒则失效不可用。
- 2、试剂六为过饱和溶液，一次实验用不完再用时可能有结晶，用之前可以再次边沸水浴边用玻璃棒搅拌使其溶解。
- 3、NOS 活性低，稳定性差，样品或匀浆上清如不马上检测，应置-20°C 以下冷冻保存。
- 4、试剂一与配制好的试剂二应尽量避免反复冻融。
- 5、室温低时，NOS 试剂五会出现浑浊，如果已经在测试管中加入了 NOS 试剂五，可将测试管对着灯光，观察有无结晶或浑浊。如果有结晶或浑浊，请将每只测试管放到 37°C 水浴锅中晃动 5 分钟，再比色。
- 6、检测范围: 0.2-81.9U/mL。