

一氧化氮合酶 (NOS) 测定试剂盒 (分型)

说明书修订日期: 2015.07.13

Cat number: KGT020

Store at -20°C for for 3 months

For Research Use Only (科研专用)

一、实验原理

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。

二、试剂盒组份

组份	KGT020	保存条件
	24 assays	
Buffer A	6.0 mL×2	-20°C
试剂 B	粉剂×3	-20°C
试剂 B 稀释液	0.6ml×3	-20°C
Buffer C	6.0 mL	4°C 避光
Buffer D	6.0 mL	室温
Buffer E	60 mL×2	4°C
Buffer F	10 mL	4°C

注意事项

1. Buffer A: 底物缓冲液 6ml×2 瓶, -20°C 以下避光冷冻保存 3 个月。临用前化冻摇匀。没有用完的试剂, 可以 -20°C 以下避光冷冻保存以备下次再用。
2. 试剂 B 工作液: 促进剂淡黄色或白色粉剂×3 支, 稀释液 0.6ml×3 支。-20°C 以下冷冻保存 6 个月。测试前取试剂 B 稀释液一支 0.6ml 加入一支粉剂中充分混匀 (即将 1.5ml 小离心管反复颠倒, 并将小离心管尖部的液体弹下来), 测试后剩余的试剂可放入 -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。
3. Buffer C: 黄色显色剂 6ml×1 瓶, 4°C 避光冷藏保存 3 个月。
4. Buffer D: 透明剂 6ml×1 瓶, 室温保存 6 个月。天冷后会凝固, 待 37°C 水浴变澄清时再使用。
5. Buffer E: 终止剂 60ml×2 瓶, 4°C 保存 6 个月。室温低时会出现浑浊, 待 37°C 水浴加热至透明后再用。
6. Buffer F: 液体 10ml×1 瓶, 4°C 保存 6 个月。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°C~100°C 热水中摇晃等其完全溶解后, 即可使用。

三、操作: (注: 样本及试剂从冰箱取出, 37°C 水浴至溶解完全, Buffer D 和 Buffer E 必须澄清透亮, 再进行操作, 否则会影响结果。)

	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*
Buffer F 抑制剂 (μl)			100	100

摇动一下试管架

Buffer A 底物缓冲液 (μl)	200	200	200	200
试剂 B 工作液 (μl)	10	10	10	10
Buffer C 显色剂 (μl)	100	100	100	100

混匀, 37°C 水浴准确反应 15 分钟

Buffer D 透明剂 (μl)	100	100	100	100
Buffer E 终止液 (μl)	2000	2000	2000	2000

混匀, 530nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管的吸光度值。

- 【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, 若有结晶或混浊可放 37°C 水浴锅内轻轻搅动几下, 混浊或结晶消失后再比色。

四、计算与举例:

(一)、血清 NOS 酶活力计算:

1. 单位定义: 每毫升血清每分钟生成 1nmol NO 为一个酶活力单位。

2. 计算公式:

$$TNOS\text{活力}(U/mL) = \frac{TNOS\text{测定管}OD\text{值} - TNOS\text{空白管}OD\text{值}}{\text{呈色物纳摩尔消光系数}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \div 1000$$

$$= \frac{TNOS\text{测定管}OD\text{值} - TNOS\text{空白管}OD\text{值}}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + a^*}{a^*} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 1000$$

$$iNOS\text{活力}(U/mL) = \frac{iNOS\text{测定管}OD\text{值} - iNOS\text{空白管}OD\text{值}}{\text{呈色物纳摩尔消光系数}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \div 1000$$

$$= \frac{iNOS\text{测定管}OD\text{值} - iNOS\text{空白管}OD\text{值}}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + a^*}{a^*} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 1000$$

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:

$$TNOS\text{活力}(U/mL) = \frac{TNOS\text{测定管}OD\text{值} - TNOS\text{空白管}OD\text{值}}{\text{呈色物纳摩尔消光系数}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \div 1000$$

$$= \frac{0.273 - 0.024}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + 0.03}{0.03} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 1000 = 36.696U/ml$$

$$iNOS\text{活力}(U/mL) = \frac{iNOS\text{测定管}OD\text{值} - iNOS\text{空白管}OD\text{值}}{\text{呈色物纳摩尔消光系数}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \div 1000$$

$$= \frac{0.149 - 0.010}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + 0.03}{0.03} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 1000 = 20.485U/ml$$

(二)、组织 NOS 酶活力计算:

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

2、计算公式：

$$TNOS活力(U/mgprot) = \frac{TNOS测定管OD值 - TNOS空白管OD值}{呈色物纳摩尔消光系数} \times \frac{反应液总体积}{取样量} \times \frac{1}{比色光径 \times 反应时间} \div 蛋白含量 (mgprot/L)$$

$$= \frac{TNOS测定管OD值 - TONS空白管OD值}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + a^*}{a^*} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 蛋白含量 (mgprot/L)$$

$$iNOS活力(U/mgprot) = \frac{iNOS测定管OD值 - iNOS空白管OD值}{呈色物纳摩尔消光系数} \times \frac{反应液总体积}{取样量} \times \frac{1}{比色光径 \times 反应时间} \div 蛋白含量 (mgprot/L)$$

$$= \frac{iNOS测定管OD值 - iNOS空白管OD值}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + a^*}{a^*} \times \frac{1}{1 \times 15} \div 蛋白含量 (mgprot/L)$$

注：mgprot = 毫克蛋白

3、计算举例：

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% 小鼠肝匀浆蛋白含量为 14.012 mgprot/ml。则计算结果为：

$$TNOS活力(U/mgprot) = \frac{TNOS测定管OD值 - TNOS空白管OD值}{呈色物纳摩尔消光系数} \times \frac{反应液总体积}{取样量} \times \frac{1}{比色光径 \times 反应时间} \div 蛋白含量 (mgprot/L)$$

$$= \frac{0.159 - 0.021}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + 0.05}{0.05} \times \frac{1}{1 \times 15} \div (14.012 \times 10^3) \text{mgprot/L} = 0.8777U/mgprot$$

$$iNOS活力(U/mgprot) = \frac{iNOS测定管OD值 - iNOS空白管OD值}{呈色物纳摩尔消光系数} \times \frac{反应液总体积}{取样量} \times \frac{1}{比色光径 \times 反应时间} \div 蛋白含量 (mgprot/L)$$

$$= \frac{0.054 - 0.008}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{2.51 + 0.05}{0.05} \times \frac{1}{1 \times 15} \div (14.012 \times 10^3) \text{mgprot/L} = 0.2926U/mgprot$$

五、正常参考值：

大鼠血清 (T-NOS)：18.69 \pm 3.97 U/ml (n=45)

10% 大鼠肾匀浆 (T-NOS)：0.536 \pm 0.134 U/mgprot (n=19)

狗血清 (T-NOS)：20.57 \pm 3.39 U/ml (n=18)

心肌培养液 (T-NOS)：0.698 \pm 0.110 U/ml (n=12)

六、注意事项：

1、试剂 B 工作液最好现配现用，配好后尽量一日内用完，如有剩余则-20 $^{\circ}$ C 以下保存不超过一周；未配置之前的试剂 B 促进剂及其稀释液均应-20 $^{\circ}$ 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、Buffer F 为过饱和溶液。一次实验用不完再用时可能有结晶，用之前可以再次边隔水加热边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 $^{\circ}$ C 以下冷冻保存。

4、室温低时，NOS Buffer E 会出现浑浊，如果已经在测试管中加入了 NOS Buffer E，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℃ 水浴锅中晃动 5 分钟，再比色。

5、本试剂盒仅用于科研。

凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

- 人类肿瘤细胞株 动物肿瘤细胞株 正常细胞株 肿瘤耐药细胞株
- 细胞提取物（RNA/DNA/蛋白）
- 细胞培养相关产品

细胞凋亡

一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase(2、3、6、8、9)系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）
- TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒
- DNA Ladder 检测试剂盒

二、细胞凋亡相关抗体

三、凋亡诱导剂、抑制剂

四、氧化应激损伤检测试剂盒

五、细胞凋亡研究辅助试剂

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

- 凯基细胞周期检测试剂盒
- MTT、XTT、WST-1、CCK-8 等系列细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

细胞染色产品

- 活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒（AO/EB 法.荧光显微镜）
- 凯基细胞凋亡形态学检测试剂盒
- 罗丹明 123、DAPI、PI、7-AAD 、Hoechst 33258、EB、吖啶橙染色试剂盒

亚细胞组分制备

- 细胞核、线粒体制备试剂盒
- 细胞悬液制备试剂盒（组织消化试剂盒）