一氧化氮合成酶（NOS）活性测定试剂盒说明书

（货号：GY1305W48 荧光法 48 样）

一、产品简介：

一氧化氮合成酶（Nitric Oxide Synthase, NOS）是催化体内合成一氧化氮（NO） 的关键酶。NO 作为一种重要的信号分子和效应分子，在心血管、神经和免疫系统中发挥关键作用。

NOS 与 L-精氨酸反应生成产物 L-瓜氨酸，使用 OPA 试剂与产物反应生成强荧光物质，通过检测其荧光强度来确定 NOS 的活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，再加入 0.6mL 的蒸馏水溶解备用，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，再加入 0.5mL 的试剂七充分溶解后，稀释 50 倍备用，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂四	粉体 mg×1 支	室温保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，再加入 1.5mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 mL×1 支	4℃保存	
试剂六	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，再加入 0.2mL 的无水乙醇溶解备用，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂七	液体 4.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂八	液体 mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	室温保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

A、反应 mix：临用前将溶解好的试剂配制成混合液，按试剂二：试剂三：试剂四=1:1:2 的比例配制混匀，现配现用。

B、工作 mix：临用前按试剂六：试剂七：试剂八=1:0.05:9 的比例配制混匀，现配现用。

三、所需的仪器和用品：

荧光酶标仪、黑色 96 孔板、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、研钵。

四、一氧化氮合成酶（NOS）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、 样本制备：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例提取。

③ 血清（浆）样本：直接检测。若浑浊，12000rpm，4℃离心 10min 后取上清检测。

2、上机测定：

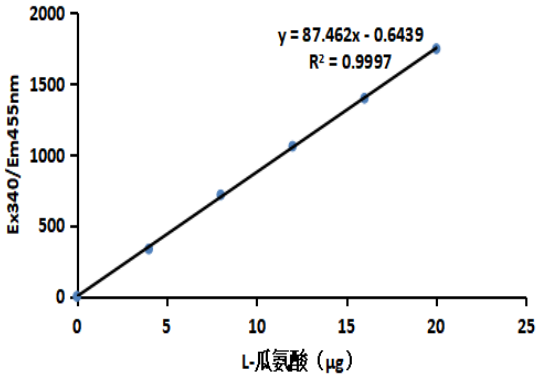
① 打开荧光酶标仪，调节波长。

② 在黑色 96 孔板中加入以下试剂：

试剂（μL）	测定	空白
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	140	140
反应 mix	40	40
混匀，37℃避光孵育 30min		
试剂五	20	20
混匀，25℃避光孵育 5min		
工作 mix	20	20
混匀，25℃避光孵育 15min，于激发波长 340nm，发散波长 455nm 处读取荧光值 F，ΔA=F 测定-F 空白。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 87.462x - 0.6439，x 为标准品质量（μg）；y 是ΔA。



2、按样本鲜重计算：

定义：每克组织每小时催化产生 1μg 的 L-瓜氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位。

NOS(μg/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.6439)÷87.462]÷(W×V1÷V)÷T=1.14×(ΔA+0.6439)÷W

3、按蛋白浓度计算：

定义：每毫克组织蛋白每小时催化产生 1μg 的 L-瓜氨酸所需酶量定义为一个酶活力单位。

NOS(μg/h/mg prot)=[(ΔA+0.6439)÷87.462]÷(Cpr×V1÷V)÷T=1.14×(ΔA+0.6439)÷Cpr

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌/细胞每小时催化产生 1μg 的 L-瓜氨酸所需酶量定为一个酶活力单位。

NOS(μg/h/10^4 cell)=[ΔA+0.6439)÷87.462]÷(500×V1÷V)÷T=0.002×(ΔA+0.6439)

5、血清（浆）活力计算:

定义：每毫升血清（浆）每小时催化产生 1μg 的 L-瓜氨酸所需酶量定为一个酶活力单位。

NOS(μg/h/mL)=[ΔA+0.6439)÷87.462]÷V1÷T=1.14×(ΔA+0.6439)

V---提取液体积，1mL； V1---反应体系中样本体积，0.02mL； T---反应时间，30min=0.5h;

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，万； D---稀释倍数，若未稀释即为 1。

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1、制备标准品母液（1mg/mL）：加 2mL 蒸馏水溶解标准品，充分混匀，得到标准品溶液（1mg/mL）。

2、把母液稀释成以下浓度：0, 0.2,04,0.6,0.8,1mg/mL。也可根据实际来调整浓度。

3、在 EP 管中加入：20μL 标准品+200μL 试剂一+20μL 衍生剂，混匀，25℃避光孵育 15min 后于激发波长 340nm，发散波长 455nm 处读取荧光值 F。依据结果即可制作标准曲线。