

## 一氧化氮合成酶（NOS）活性测定试剂盒说明书

（货号：GY1305W96 荧光法 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×2 支	4°C保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，每支加入 0.6mL 的蒸馏水溶解备用，可分装后 -20°C保存，避免反复冻融。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C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°C保存，避免反复冻融。
试剂四	粉体 mg×2 支	室温保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，每支加入 1.5mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 mL×1 支	4°C保存	
试剂六	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，再加入 0.5mL 的无水乙醇溶解备用，可分装后 -20°C保存，避免反复冻融。
试剂七	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂八	液体 mL×1 瓶	4°C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°C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°C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。

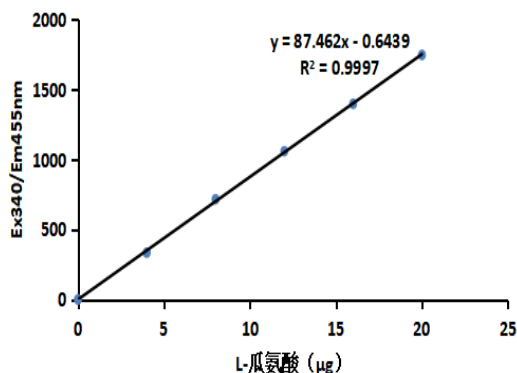
## 2、上机测定：

- 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， $\Delta A = F_{测定} - F_{空白}$ 。		

## 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  $\Delta A$ 。



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。

$$NOS(\mu\text{g}/\text{h}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.6439) \div 87.462] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1.14 \times (\Delta A + 0.6439) \div W$$

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。

$$NOS(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.6439) \div 87.462] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 1.14 \times (\Delta A + 0.6439) \div Cpr$$

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。

$$NOS(\mu\text{g}/\text{h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.6439) \div 87.462] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.002 \times (\Delta A + 0.6439)$$

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。

$$NOS(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.6439) \div 87.462] \div V1 \div T = 1.14 \times (\Delta A + 0.6439)$$

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, 0.4, 0.6, 0.8, 1mg/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3、在 EP 管中加入：20 $\mu$ L 标准品+200 $\mu$ L 试剂一+20 $\mu$ L 衍生剂，混匀，25 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min 后于激发波长 340nm，发射波长 455nm 处读取荧光值 F。依据结果即可制作标准曲线。