

总一氧化氮合成酶（T-NOS）测定试剂盒说明书(精简版)

(货号：A014-2 测总 NOS)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、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。

二、试剂组成与配制：

试剂	组分	25 管/24 样 A014-2-1	50 管/48 样 A014-2-2	保存条件
试剂一	底物缓冲液	6mL×1 瓶	6mL×2 瓶	-20℃ 避光
试剂二	促进剂	粉剂×2 支	粉剂×3 支	-20℃
		稀释液	稀释液	-20℃
		0.6 mL×2 支	0.6 mL×3 支	-20℃
(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(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),测试后剩余试剂可放入-20℃ 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,则不可以再用。				
试剂三	显色剂	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	4℃ 避光
试剂四	透明剂	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	室温
	天冷后会凝固,37℃水浴变澄清时再使用。			
试剂五	终止剂	60mL×1 瓶	60mL×2 瓶	4℃
	从冰箱取出时可能会出现浑浊,37℃加热至透明再用。			

注：-20℃ 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。

三、所需仪器耗材及试剂：

含 530nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、37℃ 恒温水浴锅或气浴箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）。

四、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)

	空白管	总 NOS 测定管
双蒸水(μL)	a*	
样本(μL)		a*
试剂一底物缓冲液(μL)	200	200
试剂二 促进剂(μL)	10	10
试剂三 显色剂(μL)	100	100
混匀,37℃ 水浴准确反应 15 分钟		
试剂四 透明剂(μL)	100	100
试剂五 终止液(μL)	2000	2000
混匀,波长 530nm,1cm 光径,双蒸水调零,分光光度计测定各管吸光度值		

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

五、计算与举例：

(一)、血清 T-NOS 酶活力计算：

1、样本前处理：直接使用。

2、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。

3、计算公式：

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

$V_{\text{反应}}$:反应液总体积,(a+2.41)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。

(二)、组织 T-NOS 酶活力计算：

1、样本前处理：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：匀浆上清需同步测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本所有售）

2、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。

3、计算公式：

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

$V_{\text{反应}}$:反应液总体积,(a+2.41)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)。

六、参考值：

大鼠血清：18.69±3.97 U/mL (n=45)

10%大鼠肾匀浆：0.536±0.134 U/mgprot (n=19)

狗血清：20.57±3.39 U/mL (n=18)

心肌培养液：0.698±0.110U/mL (n=12)

七、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℃ 以下保存不超过一周；未配制之前的 2 号促进剂和稀释液均应-20℃ 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、NOS 活性低，稳定性差，样品或匀浆上清如不马上检测，应置-20℃ 以下冷冻保存。
- 3、试剂一与配制好的试剂二应避免反复冻融。
- 4、室温低时，试剂五会出现浑浊，如果已经在测试管中加入了 NOS 5 号，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 37℃ 水浴锅中晃动 5 分钟，再比色。
- 5、检测范围：0.2-81.9U/mL。