

一氧化氮合成酶（NOS）分型测试盒/测 TNOS、iNOS、cNOS

比色法 100 管/48 样

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。

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、试剂组成与配制：

试剂一：底物缓冲液 6ml 2 瓶，-20℃ 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℃ 以下避光冷冻保存以备下次再用。

试剂二：促进剂淡黄色或白色粉剂 3 支，稀释液 0.6 ml 3 支。-20℃ 以下冷冻保存 6 个月。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（黄色）6ml 1 瓶，4℃ 避光冷藏保存 3 个月。

试剂四：透明剂 6ml 1 瓶，室温保存 6 个月。天冷后会凝固，37℃水浴变澄清时再使用。试剂五：终止剂 60ml 2 瓶，4℃ 保存 6 个月。室温低会出现浑浊，37℃水浴至透明再用。试剂六：液体 10ml×1 瓶，4℃ 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 90~100℃热水中摇晃等其完全溶解后，即可使用。

三、试剂组成与配制：

试剂一：底物缓冲液 6ml 4 瓶，-20℃ 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℃ 以下避光冷冻保存以备下次再用。

试剂二：促进剂淡黄色或白色粉剂 6 支，稀释液 0.6 ml 6 支。-20℃ 以下冷冻保存 6 个月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(黄色)6ml 2 瓶，4℃ 避光冷藏保存 3 个月。

试剂四：透明剂 6ml 2 瓶，室温保存 6 个月。天冷后会凝固，37℃水浴变澄清时再使用。

试剂五：终止剂 60ml 4 瓶，4℃ 保存 6 个月。室温低会出现浑浊，37℃水浴至透明再用。

试剂六：液体 10ml×1 瓶，4℃ 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 90~100℃热水中摇晃等其完全溶解后，即可使用。

四、操作：(注：样本及试剂从冰箱取出，平衡至室温后使用，试剂四和试剂五须 37℃水浴至澄清透亮，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*
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
混匀, 37°C 水浴准确反应 15 分钟				
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 50~100 μl, 鼠血清 30 μl, 10%的大鼠肾匀浆 50 μl, 狗血清 30 μl, 心肌培养液 100 μl。

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。

五、正常参考值:

大鼠血清 (TNOS): 18.69 ± 3.97 U/ml (n=45)

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

狗血清 (TNOS): 20.57 ± 3.39 U/ml (n=18)

心肌培养液 (TNOS): 0.698 ± 0.110 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。