

总一氧化氮合成酶 (T-NOS) 测定试剂盒

比色法: 25 管/24 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。

二、试剂组成与配制:

试剂一: 底物缓冲液 6ml 1 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。

试剂二: 促进剂淡黄色或白色粉剂 2 支, 稀释液 0.6 ml 2 支。-20°C 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 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, 则不可以再用。

试剂三: 黄色显色剂 3ml 1 瓶, 4°C 避光冷藏保存 3 个月。

试剂四: 透明剂 3ml 1 瓶, 室温保存 6 个月。天冷后会凝固, 37°C 水浴变澄清时再使用。

试剂五: 终止剂 60ml 1 瓶, 4°C 保存 6 个月。室温低会出现浑浊, 37°C 水浴至透明再用。

三、操作步骤:

(注: 样本及试剂从冰箱取出, 37°C 水浴至溶解完全, 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°C 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, 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 50~100 l, 鼠血清 30 l, 10%的大鼠肾匀浆 50 l, 狗血清 30 l, 心肌培养液 100 l。

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: 18.69±3.97 U/ml (n=45)

10%大鼠肾匀浆: 0.536±0.134 U/ml (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)

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 2 号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、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。

3、试剂一与配制好的试剂二应避免反复冻融。

4、室温低时，NOS 5 号会出现浑浊，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°C 水浴锅中晃动 5 分钟，再比色。