

一氧化氮(NO)含量(硝酸还原酶法)试剂盒

规格：100管/96样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14909

检测波长：550nm

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

NO (Nitric Oxide, NO) 广泛分布于生物体内神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统中，特别是神经组织中较丰富。它作为细胞间及细胞内的信息物质，发挥信号传递的作用，是一种新型的生物信使分子，在机体的生理、病理过程中起着重要的作用。

测定原理

NO在体内或水溶液中极易氧化变为硝酸盐和亚硝酸盐，通过硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐后，在酸性条件下，亚硝酸盐与重氮盐磺胺胺生成重氮化合物，进一步与萘基乙烯基二胺偶合，产物在550nm处有特征吸收峰，测定其吸光值，可以计算NO含量。

自备实验用品及仪器

天平、研钵或匀浆器、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水。

试剂盒组分与配制

提取液：液体110mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：粉剂×1支，-20℃避光保存。临用前加入1mL蒸馏水

试剂二：粉剂×1支，-20℃避光保存。临用前加入1mL蒸馏水

试剂三：液体55μL×1支，-20℃保存。，临用前稀释10倍，避免反复冻融

试剂四：液体1.5mL×1支，4℃避光保存。

试剂五：液体110μL×1支，-20℃保存。临用前稀释10倍，避免反复冻融

试剂六：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。（如有析出，可以60℃加热震荡15min）试剂七：

液体6mL×1瓶，4℃避光保存。（用之前60℃加热震荡15min）

标准品：液体1mLx1支，4℃避光保存。(10μmol/mL 亚硝酸钠)

试剂准备

试剂二工作液：取20μL试剂二加入1180μL蒸馏水；

显色液：临用前根据样本数量按照试剂六：试剂七=1：1充分混匀，现配现用；

标准液：临用前用蒸馏水将标准品稀释200倍至0.05μmol/mL标准溶液；

样品处理

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心15min，取上清，置冰上待测。

2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后12000rpm，4℃，离心15min，取上清置于冰上待测。

体液和培养液等其它液态样品：直接测定，若浑浊则离心取上清测定。

测定步骤和操作表

酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm。

1、操作表

试剂名称(μL)	测定管	标准管(只测一次)	空白管(只测一次)
样品	60	-	-
0.05μmol/mL标准液	-	60	-
蒸馏水	-	40	100
试剂一	5	-	-
试剂二工作液	10	-	-
试剂三	5	-	-
混匀，37℃反应120min			
试剂四	10	-	-
试剂五	10	-	-
混匀，37℃反应30min			
显色液	100	100	100
混匀，室温静置10min，于550nm处测定各管吸光值，分别记为A测定、A标准和A空白，计算ΔA测定=A测定-A空白，ΔA标准=A标准-A空白。			

注意事项

- 1、如果样本上清有颜色(在550nm下有吸收峰),则需要补测样本的对照管,可取60μL样本加入140μL蒸馏水进行测定。
- 2、如果ΔA测定小于0.005或测定管吸光值接近空白管,可以增加样本量,如果ΔA测定大于0.5,建议将样本上清用提取液适当稀释后再进行测定,修改参数带入公式重新计算。
- 3、液体样本若PH为碱性,可用提取液稀释后测定。

组织样品

(1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned}\text{NO含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W\end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{NO含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\text{NO含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times N \div V_{\text{样总}}) \\ &= 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N\end{aligned}$$

3、按液体体积计算:

$$\begin{aligned}\text{NO含量}(\mu\text{mol/mL}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \\ &= 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}\end{aligned}$$

C标: 标准管浓度, 0.05μmol/mL;

V样: 加入样本体积, 0.06mL;

V样总: 加入提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

N: 细菌/细胞总数, 以万计;

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3-5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。