

一氧化氮 (NO) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-N005 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

一氧化氮 (NO) 广泛分布于生物体内, 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。

由于一氧化氮 (NO) 本身极不稳定, 在细胞内很快代谢为硝酸盐和亚硝酸盐, 本试剂盒采用硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐, 然后与改良的 Griess Reagent 反应生成在 530nm 处有特征吸收峰的有色物质, 通过测定其吸光值的变化即可计算出待检样本中总一氧化氮 (NO) 含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 2 支	-20°C保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	粉体 1 支	-20°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1ml 蒸馏水, 若一次性用不完, 可分-20°C装保存, 避免反复冻融。
试剂三	液体 2 支	-20°C避光保存	每支: 1. 第一次开启前务必 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底再开盖 (避免试剂浪费); 2. 若一次性用不完, 可分装-20°C保存, 避免反复冻融。
试剂四	粉体 1 瓶	-20°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4.2mL 蒸馏水溶解。 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前, 可依据待检测样本数量, 把试剂五和六按照等比例混合成无色的反应 mix (注意观察, 若变粉色, 则不能使用); 2. 两天之内用完。
试剂六	液体 12mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C避光保存	1. 用天平称取 6.9mg 的标准品至一新 EP 管中, 再加 1mL 蒸馏水溶解即 100μmol/mL; 2. 再用蒸馏水稀释 1000 倍即 0.1μmol/mL, 现配现用。 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、

1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4°C×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100°C）5min 后，于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清，上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细胞/细菌样本：

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，300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；4°C×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100°C）5min 后，于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清，上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，按照细菌/细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：若浑浊先离心取澄清上清液液体检测，若是澄清液体直接检测即可（尿液样本一般需做几个样本预测定，找出适合本批样本的稀释倍数 D）。

2、检测步骤：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 530nm，蒸馏水调零。
- ② 其余试剂于 37°C 预热 5min。在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	标准管 (做一次)	空白管 (做一次)
试剂一	40	40	40
试剂二	20	20	20
试剂三	10	10	10
样本	120		
标准品		120	
蒸馏水			120
混匀，37°C 反应 60min			
试剂四	80	80	80
混匀，37°C 反应 30min			
反应 mix	400	400	400
混匀，37°C 避光反应 15min，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

- 【注】
1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以增加样本取样量（如增加至 0.2g）。若 A 测定大于 1.5，可对样本用蒸馏水稀释，则改变后的样本质量 W 和稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。
 2. 若样本自身为较明显的红色或粉红色，可增设一个样本自身对照管：120μL 样本+150μL 蒸馏水+400μL 的反应 mix，混匀，37°C 避光反应 15min，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。
 3. 若加完反应 mix 出现浑浊沉淀（如血清样本），可于 5000rpm 室温离心 5min，测定管和空白管都取出全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中于 530nm 处读取吸光值 A。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = (\text{C 标准} \times V1) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (V1 \div V \times W) \times D$$

$$= 0.1 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div W \times D$$

2、按蛋白浓度计算:

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(\text{V1}\div\text{V}\times\text{Cpr})\times\text{D} \\ =0.1\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{Cpr}\times\text{D}$$

3、按液体体积计算:

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{V1}\times\text{D} \\ =0.1\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

4、按细胞/细菌数量计算:

$$\text{NO 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(\text{V1}\div\text{V}\times 500)\times\text{D}\times 10^3 \\ =0.2\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

C 标准---0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中样品体积, 0.12mL;

W---样品质量, g;

500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 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。