

一氧化氮 (NO) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0132F 分光法 48 样)

一、产品简介:

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 处有特征吸收峰的可色物质, 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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体×2 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。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	液体 1mL×1 支	-20°C 保存	若一次性用不完, 可分装保存, 避免反复冻融。
试剂三	液体 μL×2 支	-20°C 保存	第一次开启前务必离心使微量液体落入底部 (避免试剂浪费), 若一次性用不完, 可分装保存, 避免反复冻融。
试剂四	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4°C 保存	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)。两天之内用完。
试剂六	液体 12mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉体×1 支	4°C 保存	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, 再用蒸馏水稀释 1000 倍即 0.1μmol/mL, 现配现用。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、可调式移液器、天平、研钵或匀浆器。

四、一氧化氮 (NO) 含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

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（ 10^4 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、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 530nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂可于 37°C 条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三可按照 40:20:10 比例配成混合液（一枪加 70 μ L 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μ L)	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， $\Delta A = A$ 测定 - A 空白。			

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

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

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

2、按细胞/细菌数量计算：

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

$$= 0.2 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

3、按液体体积计算：

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

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

C 标准---0.1 μ mol/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。