

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)

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有物质, 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	粉体 1 支	-20°C保存	临用前加 1ml 蒸馏水, 若一次性用不完, 可分装保存, 避免反复冻融。
试剂三	液体 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 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)、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 (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 其余试剂于 37°C 预热 5min。在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (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、按细胞/细菌数量计算：

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

3、按液体体积计算：

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

C 标准---0.1μmol/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。