

一氧化氮（NO）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-N005-96 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 2 支	-20℃ 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 0.31mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	粉体 1 支	-20℃ 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℃ 装保存，避免反复冻融。
试剂三	液体 2 支	-20℃ 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℃ 保存，避免反复冻融。
试剂四	粉体 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解。 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃ 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 6mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃ 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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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℃×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100℃）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℃×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100℃）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 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 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 530nm。

② 其余试剂于 37℃预热 5min。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	标准管（做一次）	空白管（做一次）
试剂一	5	5	5
试剂二	10	10	10
试剂三	5	5	5
样本	60		
标准品		60	
蒸馏水			60
混匀，37℃反应 60min			
试剂四	20	20	20
混匀，37℃反应 30min			
反应 mix	100	100	100
混匀，37℃避光反应 15min，于 530nm 处读取吸光值 A， ΔA=A 测定-A 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：60μL 样本+40μL 蒸馏水+100μL 的反应 mix，混匀，37℃避光反应 15min，于 530nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 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，测定管和标准管和空白管都取出 150μL 至 96 孔板中于 530nm 处读取吸光值 A。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ = 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

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：

$$\text{NO 含量}(\text{nmoL}/10^4 \text{ cell})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(\text{V1}\div\text{V}\times500)\times\text{D}\times103 \\ =0.2\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

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，0.06mL;

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