

一氧化氮（Nitric oxide, NO）含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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生成 NO_2^- ，在酸性条件下， NO_2^- 与重氮盐磺胺生成重氮化合物，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、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。（用之前 60℃ 加热震荡 15min）

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。10000g，4℃ 离心 15min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 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 10000g，4℃，离心 15min，取上清置于冰上待测。
3. 体液和培养液等其它液态样品：直接测定。

测定步骤和操作表：

	空白管	测定管
样品（ μL ）		400
提取液（ μL ）	400	
试剂一（ μL ）	250	250
试剂二（ μL ）	250	250
混匀，室温静置 15min，1mL 玻璃比色皿，测定 A_{550} ， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

NO 含量计算：

标准曲线回归方程为： $y = 0.016x - 0.0103$ ， $R^2 = 0.9986$

1、组织样品：

（1）按样本质量计算

NO 含量（ $\mu\text{mol/g}$ 鲜重）= $(\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3}$

$$= 0.14 \times (\Delta A + 0.0103) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NO 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 10^{-3} \\ &= 0.14 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、细胞:

$$\begin{aligned} \text{NO 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \\ &= 0.14 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

3、其他样品:

$$\begin{aligned} \text{NO 含量 } (\mu\text{mol/L}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \\ &= 140 \times (\Delta A + 0.0103) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.9mL; V 样: 反应中样品体积, 0.4mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL