

## 一氧化氮含量(NO)活性试剂盒

规格：50管/48样

检测原理：微量法

编号：ml301019

检测波长：550nm

### 注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

### 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变为硝酸盐和亚硝酸盐，通过硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐后，在酸性条件下，亚硝酸盐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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

### 试剂盒组分与配制：

提取液：液体 55mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：粉剂 x1 支，-20℃避光保存。临用前加入 0.5mL 蒸馏水

试剂二：粉剂 x1 支，-20°C避光保存。临用前加入 1mL 蒸馏水

试剂三：液体 30 $\mu$ Lx1 支，-20°C保存。，临用前稀释 10 倍，避免反复冻融

试剂四：液体 1mLx1 支，4°C避光保存。

试剂五：液体 60 $\mu$ Lx1 支，-20°C保存。临用前稀释 10 倍，避免反复冻融

试剂六：液体 3mLx1 瓶，4°C避光保存。（如有析出，可以 60°C加热震荡 15min）

试剂七：液体 3mLx1 瓶，4°C避光保存。（用之前 60°C加热震荡 15min）

标准品：液体 1mLx1 支，4°C避光保存。（10 $\mu$ mol/mL 亚硝酸钠）

### 试剂准备：

试剂二工作液：取 20 $\mu$ L 试剂二加入 1180 $\mu$ L 蒸馏水；

显色液：临用前根据样本数量按照试剂六：试剂七=1：1 充分混匀，现配现用；

标准液：临用前用蒸馏水将标准品稀释 200 倍至 0.05 $\mu$ mol/mL 标准溶液；

### 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。12000rpm，4°C离心 15min，取上清，置冰上待测。

**2. 细菌、真菌：**按照细胞数量（10<sup>4</sup>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 12000rpm，4°C，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，若浑浊则离心取上清测定。

### 测定步骤和操作表：

酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550nm。

## 1、操作表

试剂名称(μL)	测定管	标准管(只测一次)	空白管(只测一次)
样品	60	-	-
0.05μmol/mL 标准液	-	60	-
蒸馏水	-	40	100
试剂一	5	-	-
试剂二工作液	10	-	-
试剂三	5	-	-
混匀, 37°C反应 120min			
试剂四	10	-	-
试剂五	10	-	-
混匀, 37°C反应 30min			
显色液	100	100	100
混匀, 室温静置 10min, 于 550nm 处测定各管吸光值, 分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白, 计算 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 空白, $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。			

### 注意事项:

- 1、如果样本上清有颜色(在 550nm 下有吸收峰),则需要补测样本的对照管, 可取 60μL 样本加入 140μL 蒸馏水进行测定。
- 2、如果 $\Delta A$  测定小于 0.005 或测定管吸光值接近空白管, 可以增加样本量, 如果 $\Delta A$  测定大于 0.5, 建议将样本上清用提取液适当稀释后再进行测定, 修改参数带入公式重新计算。
- 3、液体样本若 PH 为碱性, 可用提取液稀释后测定。

## 1、组织样品:

### (1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned}\text{NO 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= \Delta A \text{ 测定} \times (\text{C 标} \div \Delta A \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div \text{W}\end{aligned}$$

### (2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{NO 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= \Delta A \text{ 测定} \times (\text{C 标} \div \Delta A \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \\ &= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

## 2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\text{NO 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A \text{ 测定} \times (\text{C 标} \div \Delta A \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \times N \div V \text{ 样总}) \\ &= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N\end{aligned}$$

## 3、按液体体积计算:

$$\begin{aligned}\text{NO 含量}(\mu\text{mol/mL}) &= \Delta A \text{ 测定} \times (\text{C 标} \div \Delta A \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div V \text{ 样} \\ &= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}\end{aligned}$$

C 标: 标准管浓度, 0.05 $\mu\text{mol/mL}$ ;

V 样: 加入样本体积, 0.06mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

N: 细菌/细胞总数, 以万计;

### 预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。