

## 一氧化氮(NO)含量(硝酸还原酶法)试剂盒

规格: 100 管/96 样

检测原理: 微量法

编号: ml301020

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 110mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂一: 粉剂 x1 支, -20℃避光保存。临用前加入 1mL 蒸馏水

试剂二：粉剂 x1 支，-20℃避光保存。临用前加入 1mL 蒸馏水

试剂三：液体 55μLx1 支，-20℃保存。，临用前稀释 10 倍，避免反复冻融

试剂四：液体 1.5mLx1 支，4℃避光保存。

试剂五：液体 110μLx1 支，-20℃保存。临用前稀释 10 倍，避免反复冻融

试剂六：液体 6mLx1 瓶，4℃避光保存。（如有析出，可以 60℃加热震荡 15min）试剂

七：液体 6mLx1 瓶，4℃避光保存。（用之前 60℃加热震荡 15min）

标准品：液体 1mLx1 支，4℃避光保存。（10μmol/mL 亚硝酸钠）

### 试剂准备：

试剂二工作液：取 20μL 试剂二加入 1180μL 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 0.05μmol/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℃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℃，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

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

$$= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

## (2)按样本蛋白浓度计算

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

$$= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div \text{Cpr}$$

## 2、按细胞数量计算:

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

$$= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N$$

## 3、按液体体积计算:

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

$$= 0.05 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

C 标: 标准管浓度,  $0.05 \mu\text{mol/mL}$ ;

V 样: 加入样本体积,  $0.06 \text{ mL}$ ;

V 样总: 加入提取液体积,  $1 \text{ mL}$ ;

Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ ;

W: 样本质量,  $\text{g}$ ;

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。