

一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒(可见分光光度法)

产品货号: BA1459

产品规格: 50管/24样

产品简介:

一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 是一种极不稳定的生物自由基, 分子小, 结构简单, 常温下为气体, 微溶于水, 具有脂溶性, 可快速透过生物膜扩散, 作为一种新型的生物信使分子, 在细胞间及细胞内发挥传递信号的作用。其广泛分布于生物体内各组织中, 特别是神经组织中。在机体神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统中也起着十分重要的作用。

NO在体内或水溶液中极易氧化生成NO₂和NO₃⁻, 本法利用硝酸还原酶特异性将NO₃⁻还原成NO₂⁻, 在酸性条件下, NO₂⁻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。

技术指标:

最低检出限: 0.0004μmol/mL

线性范围: 0.00078-0.1μmol/mL

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	4°C
试剂一	粉剂×2瓶	-20°C
试剂二	液体6mL×1瓶	4°C
显色液A液	液体20mL×1瓶	4°C
显色液B液	液体20mL×1瓶	4°C
标准品	液体1mL×1支	4°C

溶液的配制:

1. 试剂一: 粉剂置于试剂瓶内EP管中, 管内粉剂含量非常少, 很难观察查到, 直接使用即可。临用前加入2.5mL蒸馏水混匀, -20°C分装保存;
2. 显色液: 临用前按照实验所需用量按A液: B液=1:1充分混匀, 现配现用;
3. 标准品: 10μmol/mL亚硝酸钠。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 组织样本: 按质量 (g): 提取液体积 (mL) 1: 5~10比例 (建议称取0.2g样本, 加入1.0mL提取液) 加入提取液, 冰浴匀浆后, 于4°C, 12000rpm, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
2. 细胞样本: 按细胞数量 (10⁴): 提取液体积 (mL) 500~1000: 1的比例 (建议1000万细胞加入1.0mL提取液)



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

加入提取液，冰浴超声破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔7s，总时间3min），然后于4°C，12000rpm，离心15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。

3. 液体样本：直接测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。

2. 将试剂一置于冰上备用。

3. 标准液的制备：将标准品用蒸馏水稀释至0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.0015625 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液。

4. 操作表：（在1.5mLEP管中操作）

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	600		100
标准液			500
样本		500	
试剂一		100	
漩涡混匀，37°C水浴60min			
试剂二	100	100	100
漩涡混匀，室温静置5min，3500rpm离心10min，取上清			
上清液	500	500	500
显色液	500	500	500
漩涡混匀，室温静置10min，吸取1mL反应液于1mL玻璃比色皿在550nm下测定吸光值A，分别记为A标准、A测定、A空白，计算 $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}$ 。（空白管只需测定1-2次）			

三、NO含量计算

1. 标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2. NO含量的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/g质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = x \div W$$

(3) 按样本细胞数量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) = x \div \text{细胞数量}$$

(4) 按样本液体体积计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/mL}) = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = x$$

V样：加入样本体积，0.5mL；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；细胞数量：以 10^4 为单位，万个。

注意事项：

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

2. 尽量使用新鲜样本进行检测，试剂二具有腐蚀性，操作时请做好防护措施。

3. 组织颜色对实验结果无影响。

4. 当要测定的培养液中有颜色时（在550nm下有吸收峰），则需要补测样本的对照管，即将试剂一和显色液用相同体积的蒸馏水代替。在550nm下测定吸光值A，分别记为A标准、A测定、A空白、A对照，计算 $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}$ 。此时试剂盒规格为50T/24S。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com