

一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒(化学法)(可见分光光度法)

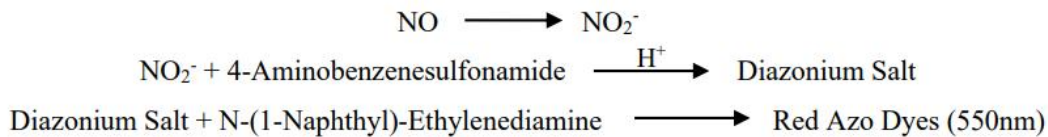
产品货号: BA1459

产品规格: 50管/48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⁻, 在酸性条件下, NO₂⁻与重氮盐磺酰胺生成重氮化合物, 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。



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	2-8°C
试剂一	粉剂×1瓶	2-8°C
显色液A液	液体15mL×1瓶	2-8°C
显色液B液	液体15mL×1瓶	2-8°C
标准品	液体1mL×1支	2-8°C

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加入15mL蒸馏水, 可50°C助溶, 2-8°C可保存12周。冷却至常温使用;
2. 显色液: 临用前根据样本数量按照显色液A液: 显色液B液=250μL: 250μL (500μL, 1T) 的比例配制显色液, 充分混匀, 现配现用;
3. 标准品: 10μmol/mL亚硝酸钠。
4. 0.025μmol/mL标准溶液的配制: 取50μL 10μmol/mL亚硝酸钠, 加入950μL蒸馏水, 配制浓度为0.5μmol/mL; 再取50μL 0.5μmol/mL亚硝酸钠和950μL蒸馏水混匀配制成0.025μmol/mL的标准溶液备用。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、分析天平、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

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) 2~5: 10的比例加入提取液 (建议称取0.2g样本, 加入1.0mL提取液), 冰浴匀浆后, 于4°C, 10000g, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
2. 细菌/细胞样本: 按细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液体积 (mL) 1000~2000: 1的比例加入提取液 (建议1000万细菌/细胞加入1.0mL提取液), 冰浴超声破碎细菌/细胞 (功率200w, 超声3s, 间隔7s, 总时间5min), 然后于4°C, 10000g, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
3. 血清 (血浆) 等液体样本: 直接测定。若液体有浑浊则离心取上清测定。

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。



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

2. 在1.5mL EP管按下表顺序加样:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
蒸馏水	-	-	500
标准品	-	500	-
样本	500	-	-
试剂一	250	250	250
充分混匀, 常温静置5min, 于4°C, 10000g离心5min, 取上清 (标准管、空白管可不进行此步骤)			
上清液	500	500	500
显色液	500	500	500
混匀, 常温静置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ΔA测定=A测定-A空白, ΔA标准=A标准-A空白。空白管和标准管只需测1-2次。			

三、NO含量计算

1. 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

3. 按细菌/细胞数量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times N \div V_{\text{样总}}) = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

4. 按液体体积计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标: 标准管浓度, 0.025μmol/mL; 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; N: 细菌/细胞总数, 以10⁴计。

注意事项:

- 如果ΔA测定小于0.005, 可以增加样本量后再进行测定; 如果ΔA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。注意同步修改计算公式。
- 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, 即将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ΔA标准=A标准-A空白, ΔA测定=A测定-A对照。此时试剂盒规格为50T/24S。

实验实例:

- 取0.203g合欢叶片样本, 加入1mL提取液进行冰浴匀浆, 离心后取上清, 按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算: ΔA测定=A测定-A空白=0.046-0.000=0.046, ΔA标准=A标准-A空白=0.290-0.000=0.290, 按样本质量计算得:
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.0195 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$
- 取0.215g小鼠心脏样本, 加入1mL提取液进行冰浴匀浆, 离心后取上清, 按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算: ΔA测定=A测定-A空白=0.082-0.000=0.082, ΔA标准=A标准-A空白=0.290-0.000=0.290, 按样本质量计算得:
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.0329 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$
- 取500μL人血清样本, 按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算: ΔA测定=A测定-A空白=0.028-0.000=0.028, ΔA标准=A标准-A空白=0.290-0.000=0.290, 按液体体积计算得:
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = 0.025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.0024 \mu\text{mol}/\text{mL}。$



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