

## 一氧化氮(NO)含量检测试剂盒（酶法测定总NO，微量法）

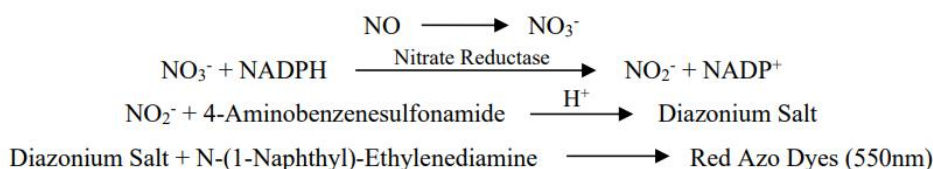
产品货号：BA2253

产品规格：100T/96S

### 产品说明：

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NO<sub>2</sub><sup>-</sup>和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，本法利用硝酸还原酶特异性将NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原成NO<sub>2</sub><sup>-</sup>，在酸性条件下，NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1支	-20℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	液体1.5mL×1支	2-8℃
试剂五	液体25 μL×1支	2-8℃
显色液A液	液体6mL×1瓶	2-8℃
显色液B液	液体6mL×1瓶	2-8℃
澄清剂	粉剂×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入1.8mL蒸馏水，-20℃分装保存4周，避免反复冻融；
2. 试剂二：临用前加入1mL蒸馏水，-20℃分装保存4周，避免反复冻融；
3. 试剂二工作液：临用前根据样本量按试剂二：蒸馏水=10 μL：590 μL（60T）的比例配制，当天用完；
4. 试剂三：临用前加入550 μL蒸馏水溶解，-20℃分装保存4周，避免反复冻融；
5. 试剂五：临用前根据样本数量按照试剂五：蒸馏水=5 μL：225 μL（23T）的比例配制试剂五溶液，现用现配；
6. 显色液：临用前根据样本数量按照显色液A液：显色液B液=1:1充分混匀，现配现用；



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

- 澄清剂：临用前加入6mL蒸馏水，可震荡或50℃加热促进溶解。此溶液为饱和溶液，取上清使用即可。2-8℃可保存12周；
- 标准液：10 μmol/mL亚硝酸钠。临用前取20 μL 10 μmol/mL标准液，加入380 μL蒸馏水，配制成0.5 μmol/mL标准液，再取0.5 μmol/mL标准液50 μL和蒸馏水450 μL混合配制成0.05 μmol/mL标准溶液。

### 自备材料：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

### 测定步骤：

#### 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）

- 组织样本：按质量（g）：提取液体积（mL）1：5~10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℃，12000rpm，离心15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
- 细菌/细胞样本：按细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液体积（mL）500~1000：1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℃，12000rpm，离心15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
- 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

- 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 操作表：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	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℃反应120min			
试剂四	10	-	-
试剂五	10	-	-
混匀，37℃反应30min			
显色液	100	100	100
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活性计算

##### 1. 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (\text{C标} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

##### 2. 按样本质量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (\text{C标} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

##### 3. 按细胞/细菌数目计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (\text{C标} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times N \div V_{\text{样总}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

##### 4. 按液体体积计算



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

$\text{NO含量} (\mu\text{mol/mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$

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, g; N: 细菌/细胞总数, 以 $10^4$ 计。

#### 注意事项:

1. 如果样本匀浆液离心后上清仍旧浑浊, 可直接进行反应, 反应后在 $200 \mu\text{L}$ 反应液中加入 $50 \mu\text{L}$ 澄清剂, 混匀后静置 $5 \text{min}$ , 离心后取 $200 \mu\text{L}$ 上清测定, 这种情况下需将空白管和标准管进行相同处理。
2. 如果 $\Delta A$ 测定小于 $0.005$ 或测定管吸光值接近空白管, 可以增加样本量后再进行测定; 如果 $\Delta A$ 测定大于 $0.6$ , 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。
3. 如果样本上清有颜色 (在 $550 \text{nm}$ 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 $550 \text{nm}$ 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100T/48S。



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>