

一氧化氮(NO)含量检测试剂盒

(酶法测定总NO, 可见分光光度法)

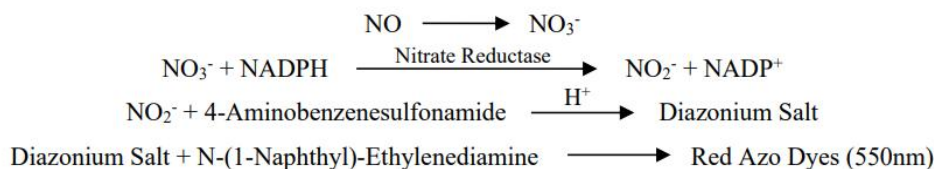
产品货号: BA2252

产品规格: 50T/48S

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℃
试剂一	粉剂×1支	-20℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×2支	-20℃
试剂四	液体3mL×1支	2-8℃
试剂五	液体50 μL×1支	2-8℃
显色液A液	液体15mL×1瓶	2-8℃
显色液B液	液体15mL×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℃分装保存两周, 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℃分装保存两周, 避免反复冻融;
5. 试剂五: 临用前根据样本数量按照试剂五 (V): 蒸馏水 (V) =10 μL: 450 μL (11T) 的比例配制试剂五溶



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

液，现用现配；

- 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；
- 澄清剂：临用前加入15mL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780 μL蒸馏水，配制成0.25 μmol/mL标准液，再取0.25 μmol/mL标准液50 μL和蒸馏水450 μL混合配制成0.025 μmol/mL标准溶液。

自备材料：

可见分光光度计、低温离心机、分析天平、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/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（10⁴）：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

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

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	240	-	-
0.025μmol/mL标准液	-	240	-
蒸馏水	-	160	400
试剂一	20	-	-
试剂二工作液	40	-	-
试剂三	20	-	-
混匀，37℃反应120min		-	-
试剂四	40	-	-
试剂五	40	-	-
混匀，37℃反应30min		-	-
显色液	400	400	400

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 Δ A测定=A测定-A空白，Δ A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

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

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. 按细胞/细菌数量计算



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

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

4. 按液体体积计算

$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta\text{A测定} \times (\text{C标} \div \Delta\text{A标准}) \times \text{V样} \div \text{V样} = 0.025 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准}$

C标: 标准管浓度, $0.025 \mu\text{mol}/\text{mL}$; V样: 加入样本体积, 0.24mL ; 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 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 1mL 反应液中加入 $250 \mu\text{L}$ 澄清剂, 混匀后静置 5min , 离心后取 1mL 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 ΔA 测定小于 0.01 , 可以增加样本量后再进行测定; 如果 ΔA 测定大于 0.8 , 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 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 $\Delta\text{A标准} = \text{A标准} - \text{A空白}$, $\Delta\text{A测定} = \text{A测定} - \text{A对照}$ 。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>