

一氧化氮（NO）含量测定试剂盒说明书

（货号：G0132F 分光法 48 样）

一、产品简介：

一氧化氮（NO）广泛分布于生物体内，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。

由于一氧化氮（NO）本身极不稳定，在细胞内很快代谢为硝酸盐和亚硝酸盐，本试剂盒采用硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐，然后与改良的 Griess Reagent 反应生成在 530nm 处有特征吸收峰的可色物质，通过测定其吸光值的变化即可计算出待检样本中总一氧化氮（NO）含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体×2 支	-20℃ 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体 1mL×1 支	-20℃ 保存	若一次性用不完，可分装保存，避免反复冻融。
试剂三	液体μL×2 支	-20℃ 保存	第一次开启前务必离心使微量液体落入底部（避免试剂浪费），若一次性用不完，可分装保存，避免反复冻融。
试剂四	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 4.2mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	临用前，可依据待检测样本数量，把试剂五和六按照等比例混合成无色的反应 mix（ 注意观察，若变粉色，则不能使用 ）。两天之内用完。
试剂六	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体×1 支	4℃ 保存	用天平称取 6.9mg 的标准品至一新 EP 管中，再加 1mL 蒸馏水溶解即 100μmol/mL，再用蒸馏水稀释 1000 倍即 0.1μmol/mL，现配现用。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、研钵或匀浆器。

四、一氧化氮（NO）含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100℃）5min 后，于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清，上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细胞/细菌样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；4℃×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100℃）5min 后，于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清，

上清置冰上待测。

【注】:若增加样本量,按照细菌/细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

- ③ 液体样本:若浑浊先离心取澄清上清液检测,若是澄清液体直接检测即可(尿液样本一般需做几个样本预测定,找出适合本批样本的稀释倍数D)。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热30min以上,调节波长至530nm,蒸馏水调零。
② 其余试剂于37℃预热5min。在EP管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	标准管(做一次)	空白管(做一次)
试剂一	40	40	40
试剂二	20	20	20
试剂三	10	10	10
样本	120		
标准品		120	
蒸馏水			120
混匀, 37℃反应60min			
试剂四	80	80	80
混匀, 37℃反应30min			
反应 mix	400	400	400
混匀, 37℃避光反应15min, 全部上清液转移至1mL玻璃比色皿(光径1cm)中, 于530nm处读取吸光值A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

- 【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊,可以增加样本取样量(如增加至0.2g)。若A测定大于1.5,可对样本用蒸馏水稀释,则改变后的样本质量W和稀释倍数D需代入计算公式重新计算。
2. 若样本自身为较明显的红色或粉红色,可增设一个样本自身对照管:120μL样本+150μL蒸馏水+400μL的反应mix,混匀,37℃避光反应15min,于530nm处读取吸光值A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。
3. 若加完反应mix出现浑浊沉淀(如血清样本),可于5000rpm室温离心5min,测定管和空白管都取出全部上清液至1mL玻璃比色皿中于530nm处读取吸光值A。

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ = 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按细胞/细菌数量计算:

$$\text{NO 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times 500) \times D \times 10^3 \\ = 0.2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3、按液体体积计算:

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ = 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

C 标准---0.1μmol/mL;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中样品体积, 0.12mL;

W---样品质量, g;

500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为1。