

一氧化氮（NO）含量测定试剂盒说明书

（货号：G0132W 微板法 96 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 100mL×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 0.31mL 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 2.1mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 6mL×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 6mL×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：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、研钵或匀浆器、蒸馏水。

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 比例进行提取。

- ③ 液体样本：若浑浊先离心取澄清上清液液体检测，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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm。
② 其余试剂于 37℃ 预热 5min。在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	标准管（做一次）	空白管（做一次）
试剂一	5	5	5
试剂二	10	10	10
试剂三	5	5	5
样本	60		
标准品		60	
蒸馏水			60
混匀，37℃ 反应 60min			
试剂四	20	20	20
混匀，37℃ 反应 30min			
反应 mix	100	100	100
混匀，37℃ 避光反应 15min，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

- 【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：60μL 样本+40μL 蒸馏水+100μL 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，测定管和标准管和空白管都取出 150μL 至 96 孔板中于 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：

$$\text{NO 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times 500) \times D \times 103 \\ = 0.2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

- 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，0.06mL；

W---样品质量，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。