

# 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒(可见分光光度法)

产品货号: BA1459

产品规格: 50管/24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。

## 技术指标:

最低检出限: 0.0004μmol/mL

线性范围: 0.00078-0.1μmol/mL

**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 | 4℃   |
| 试剂一   | 粉剂×2瓶     | -20℃ |
| 试剂二   | 液体6mL×1瓶  | 4℃   |
| 显色液A液 | 液体20mL×1瓶 | 4℃   |
| 显色液B液 | 液体20mL×1瓶 | 4℃   |
| 标准品   | 液体1mL×1支  | 4℃   |

溶液的配制:

1. 试剂一: 粉剂置于试剂瓶内EP管中, 管内粉剂含量非常少, 很难观察查到, 直接使用即可。临用前加入2.5mL蒸馏水混匀, -20℃分装保存;
2. 显色液: 临用前按照实验所需用量按A液: B液=1:1充分混匀, 现配现用;
3. 标准品: 10μmol/mL亚硝酸钠。

## 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、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、冰和蒸馏水、EP管。

## 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) 1: 5~10比例 (建议称取0.2g样本, 加入1.0mL提取液) 加入提取液, 冰浴匀浆后, 于4℃, 12000rpm, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
2. 细胞样本: 按细胞数量 (10<sup>4</sup>): 提取液体积 (mL) 500~1000: 1的比例 (建议1000万细胞加入1.0mL提取液) 加入提取液, 冰浴超声破碎细胞 (功率300w, 超声3s, 间隔7s, 总时间3min), 然后于4℃, 12000rpm, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

3. 液体样本：直接测定。

## 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。

2. 将试剂一置于冰上备用。

3. 标准液的制备：将标准品用蒸馏水稀释至0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.0015625 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液。

4. 操作表：（在1.5mLEP管中操作）

| 试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )  | 空白管 | 测定管 | 标准管 |
|---|-----|-----|-----|
| 蒸馏水   | 600 |     | 100 |
| 标准液   |     |     | 500 |
| 样本  |     | 500 |     |
| 试剂一   |     | 100 |     |
| 漩涡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴60min  |     |     |     |
| 试剂二   | 100 | 100 | 100 |
| 漩涡混匀，室温静置5min，3500rpm离心10min，取上清  |     |     |     |
| 上清液   | 500 | 500 | 500 |
| 显色液   | 500 | 500 | 500 |
| 漩涡混匀，室温静置10min，吸取1mL反应液于1mL玻璃比色皿在550nm下测定吸光值A，分别记为A标准、A测定、A空白，计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白管只需测定1-2次） |     |     |     |

## 三、NO含量计算

1. 标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入方程得到x ( $\mu\text{mol/mL}$ )。

2. NO含量的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/g质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = x \div W$$

(3) 按样本细胞数量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) = x \div \text{细胞数量}$$

(4) 按样本液体体积计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/mL}) = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = x$$

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；细胞数量：以 $10^4$ 为单位，万个。

## 注意事项：

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

2. 尽量使用新鲜样本进行检测，试剂二具有腐蚀性，操作时请做好防护措施。

3. 组织颜色对实验结果无影响。

4. 当要测定的培养液中有颜色时（在550nm下有吸收峰），则需要补测样本的对照管，即将试剂一和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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。此时试剂盒规格为50T/24S。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com