

一氧化氮(NO)含量检测试剂盒（酶法测定总NO，微量法）

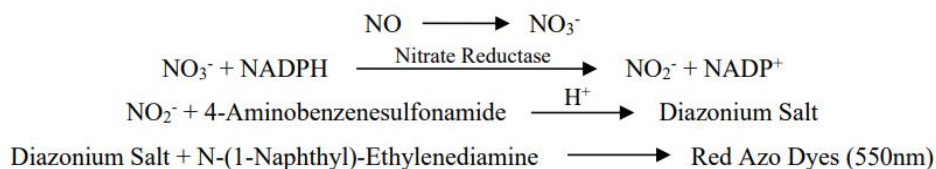
产品货号：BA2253

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

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

- 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（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/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

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

2. 按样本质量计算

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

3. 按细胞/细菌数目计算

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

4. 按液体体积计算

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



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

C标：标准管浓度， $0.05\mu\text{mol/mL}$ ；V样：加入样本体积， 0.06mL ；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 $200\mu\text{L}$ 反应液中加入 $50\mu\text{L}$ 澄清剂，混匀后静置 5min ，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 ΔA 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 ΔA 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 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 $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}$ 。此时试剂盒规格为100T/48S。



扫一扫 加微信

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