

# 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)

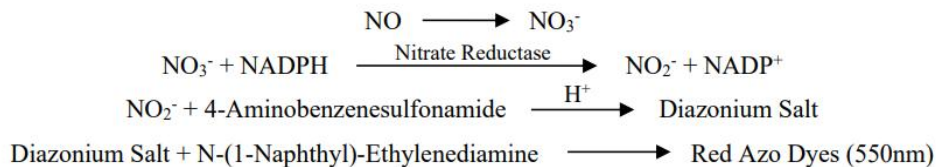
产品货号: BA2252

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。



**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液, 现用现配;



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

- 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（10<sup>4</sup>）：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

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

###### 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

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

###### 4. 按液体体积计算



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

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

C标：标准管浓度，0.025 $\mu\text{mol/mL}$ ；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 $\Delta A$ 测定小于0.01，可以增加样本量后再进行测定；如果 $\Delta A$ 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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。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