

一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (微量法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0306	一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃
试剂一	液体 3mL×1 瓶	4℃, 避光
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃
标准品	液体 6mL×1 瓶	4℃, 避光

一、产品说明

一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 广泛分布于生物体内神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统中, 特别是神经组织中较丰富。它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。

NO 在体内或水溶液中极易氧化生成 NO₂⁻, 在酸性条件下, NO₂⁻与重氮盐磺胺脒生成重氮化合物, 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。为了排除样品色素等的影响, 每个样品需做对照管。

二、自备材料

天平、研钵或匀浆器、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

三、样本准备:

- 1、组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细菌/真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 12000rpm, 4℃, 离心 15min, 取上清置于冰上待测。
- 3、体液和培养液等其它液态样品: 直接测定。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 蒸馏水调零。
- 2、加样表 (使用 1.5mL 离心管)

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
样品	100	100
试剂一		50
试剂二	50	

试剂三	50	50
混匀, 4℃室温静置 15min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 对照管调零, 测定 550nm 处吸光值, 记为 A 550。		

五、NO 含量的计算

A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、标准曲线回归方程为: $y = 0.016x - 0.0103$, $R^2 = 0.9986$ 。

2、按照样本质量计算

NO 含量定义: 25℃时, 每克样品或每毫克蛋白 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/g}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3}$$

$$= 0.125 \times (A 550 + 0.0103) \div W。$$

3、按样本蛋白浓度计算

NO 含量定义: 25℃时, 每克样品或每毫克蛋白 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3}$$

$$= 0.125 \times (A 550 + 0.0103) \div C_{\text{pr}}。$$

4、其它样品

NO 含量定义: 25℃时, 每升样品 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/L}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}$$

$$= 125 \times (A 550 + 0.0103)$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 反应中样品体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL。

B. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准曲线回归方程为: $y = 0.008x - 0.0103$, $R^2 = 0.9986$ 。

2、按照样本质量计算

NO 含量定义: 25℃时, 每克样品或每毫克蛋白 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/g}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3}$$

$$= 0.25 \times (A 550 + 0.0103) \div W。$$

3、按样本蛋白浓度计算

NO 含量定义: 25℃时, 每克样品或每毫克蛋白 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3}$$

$$= 0.25 \times (A 550 + 0.0103) \div C_{\text{pr}}。$$

4、细胞

NO 含量定义: 25℃时, 每 10^4 个细胞 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3}$$

$$= 0.25 \times (A 550 + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

5、其它样品

NO 含量定义: 25℃时, 每升样品 15min 生成 $1\mu\text{mol NO}^{2-}$, 相当于 $1\mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/L}) = (A 550 + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 250 \times (A 550 + 0.0103)$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 反应中样品体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL。

六、注意事项

- 1、尽量使用新鲜样品进行检测，试剂三有腐蚀性，操作时请做好防护措施。
- 2、若检测出得 OD 值在标准曲线范围外，请将样品进行适当的浓缩或稀释，并在计算公式中除以浓缩倍数或者乘以稀释倍数。
- 3、最低检出限为 0.65 μ mol/L。
- 4、试剂盒 2-8℃保存。