



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

一氧化氮(NO) (硝酸还原酶法) 含量检测试剂盒 微板法

货号: R33083

规格: 96T

保存温度: -20℃避光保存, 有效期 3 个月。

产品简介:

一氧化氮(NO)广泛分布于生物体内, 分子小, 结构简单, 微溶于水, 具有脂溶性, 可快速透过生物膜扩散, 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 NO₂-和 NO₃-, 本试剂盒采用硝酸盐还原酶将 NO₃-还原成 NO₂-, 然后与改良的 Griess Reagent 反应生成在 530nm 处有特征吸收峰的有色物质, 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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存	
试剂一	粉末×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×2 支	-20℃保存	若一次性用不完, 可分装保存, 避免反复冻融。
试剂四	粉末×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存	临用前, 根据待测样本数量, 等比例混合试剂五、六成无色混合溶液(若混合溶液变粉色, 则不能使用), 两天内用完。
试剂六	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存	
标准品	粉末×1 支	2-8℃保存	临用前称取 6.9mg 的标准品至一新离心管中, 再加 1mL 的蒸馏水溶解, 再用蒸馏水稀释 1000



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

			倍, 即 0.1 μ mol/mL, 现配现用。
--	--	--	------------------------------

使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费。

一、样本准备

1. 组织样本准备:

- 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- 8000rpm, 4℃离心 10min, 取上清;
- 将上清液沸水浴(95-100℃)5min;
- 12000rpm 离心 5min 后取上清, 置于冰上待测。

【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/细胞样本准备:

- 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;
- 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 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);
- 8000rpm, 4℃离心 10min, 取上清液沸水(95-100℃)5min,
- 12000rpm 离心 5min 后取上清, 上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液进行提取。

3. 液体样本准备:

若浑浊先离心取上清液液体检测, 若是液体澄清直接检测即可(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)。

二、样品测定

- 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 530nm。
- 其余试剂于 37℃预热 5min。
- 在 96 孔板中依次加入:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyssw@sina.com

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 60min			
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。

三、含量计算

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:

$$\text{NO 含量}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times 500) \times D \times 10^3 = 0.2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3. 按液体体积计算:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = (\text{C 标准} \times V1) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div V1 \times D$$
$$= 0.1 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times D$$

$\Delta A = \text{A 测定} - \text{A 空白}$

C 标准---0.1 $\mu\text{mol/mL}$

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, 百万

D---稀释倍数, 未稀释即为 1

注意事项:

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

