

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

# 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒

微量法

Do not eat

Store at +2 to +8° C



Cat.No. MG28827

Size : 100T/96S

Technical literature is available at: [www.mesgenbio.com](http://www.mesgenbio.com).E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: [tech@mesgenbio.com](mailto:tech@mesgenbio.com)

## 产品说明

一氧化氮 (NitricOxide, 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<sup>2</sup>和NO<sup>3</sup>, 本法利用硝酸还原酶特异性将NO<sup>3</sup>还原成NO<sup>2</sup>, 在酸性条件下, NO<sup>2</sup>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。

## 产品组成

使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110ml×1瓶	4°C
试剂一	粉剂×1瓶	-20°C
试剂二	液体3ml×1瓶	4°C
显色液A液	液体10ml×1瓶	4°C
显色液B液	液体10ml×1瓶	4°C
标准品	液体1ml×1瓶	4°C

## 技术指标

最低检出限: 0.00074μmol/mL

线性范围: 0.00078-0.25μmol/mL

## 需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、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、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°C, 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°C, 12000rpm, 离心15min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。

### 3. 液体样本:

直接测定。

## 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热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: 将标准品用蒸馏水倍比稀释至0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125μmol/mL标准液。

4. 操作表: (在0.6mLEP管中操作)

试剂名称(μL)	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	120		20
标准液			100
样本		100	
试剂一		20	
漩涡混匀, 37°C水浴60min			
试剂二	20	20	20
漩涡混匀, 室温静置5 min, 3500 rpm离心10min, 取上清			
上清液	100	100	100
显色液	100	100	100
漩涡混匀, 室温静置10min, 用微量玻璃比色皿/96孔板在550nm下测定吸光值A, 分别记为A标准、A测定、A空白, 计算 $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$ , $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$ 。(空白管只需测定1-2次)			

代替。在550 nm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 $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$ ,  $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$ 。此时试剂盒规格为100T/48S。

**产品仅供科学研究 禁止用于临床诊断、治疗**

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

**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 $\Delta A_{标准}$ 为y轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$ , 将 $\Delta A_{测定}$ 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**

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

**(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<sub>样</sub>: 加入样本体积, 0.1mL;

V<sub>样总</sub>: 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