

# 一氧化氮 (NO) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A013-2-1 一步法 微板法 96T)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、测定意义及原理:

一氧化氮 NO (即血管内皮舒张因子), 在生物体内作为一种反应性极强的自由基, 兼有第二信使和神经递质作用, 同时又是一种效应分子, 在体内具有广泛的生理作用, 如松弛血管平滑肌, 抑制血小板聚集, 调节脑血流, 介导细胞毒效应和免疫调节, 参与学习和记忆、动脉粥样硬化等作用。NO 产生异常与某些疾病的发生发展有着密切关系。因此, 近年来对 NO 的研究越来越受到广大医学科学工作者的重视。

NO 本身半衰期极短, 血液中的 NO 主要由血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、血小板、巨噬细胞等产生以硝酸盐及亚硝酸盐的形式存在, 通过其浓度可以间接测知 NO 浓度。

NO 遇氧及水生成硝酸盐及亚硝酸盐, 后者遇硝酸盐显色剂可生成淡红色偶氮化合物, 通过比色可间接测知 NO 浓度。

## 二、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一:** 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存。

**试剂二:** 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。

**试剂三:** 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。(过饱和溶液, 如有结晶析出, 60℃ 以上加热溶解完全以后使用)

**试剂四:** 液体 3mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

**试剂五:** 液体 3mL×1 瓶, 4℃ 保存。

**显色剂的配制:** 试剂三: 试剂四: 试剂五=2.5 : 1 : 1, 现用现配, 配好的显色剂放冰箱保存, 颜色变得很深后不可再用。

**2mmol/L 亚硝酸钠标准液:** 1mL×1 支, 4℃ 保存。用前取按 1:99 的比例加蒸馏水稀释成 20μmol/L 亚硝酸钠标准液, 现用现配, 用多少配多少。

## 三、所需仪器耗材及试剂:

含 550nm 波长的酶标仪及 96 孔板 (附送一块)、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 三、操作过程:

### 1、样本前处理:

**血清(浆):** 取血清(浆)原液 100μL 加试剂一 200μL, 混匀, 加试剂二 100μL, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160μL 操作。

**动物组织:** 称重, 按重量体积比 1(g):9(mL) 的比例加入生理盐水, 机械匀浆, 3500 转/分钟离心 10 分钟, 取上清即 10% 匀浆上清 300μL 加试剂一 200μL, 混匀, 加试剂二 100μL, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160μL 操作。

**植物组织:** 取植物组织, 用清水清洗表面污渍, 吸干表面水渍, 剪碎, 放入研钵中, 加入液氮, 快速研磨成粉状, 再转移至可以密封的容器 (如离心管、自封袋等) 中; 取该植物粉末称重, 按重量体积比 1(g):4(mL) 的比例加入磷酸盐缓冲液 (0.1M, PH7.0-7.4) 放入研磨仪中研磨 (50hz, 30 秒/次, 运行 2-3 次), 取出, 3500 转/分钟离心 10 分钟, 取上清即 20% 匀浆上清 300μL 加试剂一 200μL, 混匀, 加试剂二 100μL, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160μL 操作。

**培养细胞:** 将制备好的细胞悬液取出, 1000 转/分钟, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推

荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心直接取 300μL 加试剂一 200μL, 混匀, 再加试剂二 100μL, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160μL 操作。

### 2.操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水 (mL)	0.16		
20μmol/L 亚硝酸钠标准液 (mL)		0.16	
上清液 (mL)			0.16
显色剂 (mL)	0.08	0.08	0.08
混匀, 静置 15 分钟, 波长 550nm, 酶标仪测定各孔吸光度值			

## 四、计算公式:

### 血清计算公式:

$$\text{NO 含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

### 动物组织计算公式:

$$\text{NO 含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

### 植物组织计算公式:

$$\text{NO 含量} (\mu\text{mol/g组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times V_{\text{提取液}} \div W$$

注:  $C_{\text{标准}}$  为标准品浓度, 20μmol/L;  $N$  为样本稀释测定前处理过程的稀释倍数, 血清为 4, 组织为 2;  $C_{\text{pr}}$  为组织匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);  $V_{\text{提取液}}$  为提取样本时加入的提取液的体积 (L);  $W$  为称取的样本的质量 (g)。

## 五、技术参数:

项目序号	指标名称	指标要求
1	试剂盒检出限	0.2μmol/L
2	试剂盒批内 CV	2.11%
3	试剂盒批间 CV	5.65%
4	试剂盒回收率	99.5%
5	线性范围 0.2~50μmol/L	$R^2=0.999$
6	波长选择范围	530nm~570nm

## 六、操作注意点:

- 1、 本法对于测定一些含量较低的样本 (如一些培养细胞) 时存在一定的缺陷, 此时建议使用本公司另一款 NO 试剂盒 (货号 A012, 硝酸还原酶法) 测定。
- 2、 离心后的上层液一定要澄清, 若有混浊要再次离心。
- 3、 溶血及混浊血清对测定结果有影响。
- 4、 血清及组织块 -20℃ 冷冻后可保存 1~2 个月。温度越低保存时间越长。零上 4~5℃ 保存三天。
- 5、 培养液的测定参照血清 (浆) 的操作及计算。

## 附录 I :标准曲线制备（选做）

### 1、前处理:

用双蒸水将 2mmol/L 亚硝酸钠标准液进行:1:39、1:79、1:99、1:159、1:319、1:639 稀释。即亚硝酸钠标准液浓度依次为: 0.05mmol/L、0.025mmol/L、0.02mmol/L、0.0125mmol/L、0.00625mmol/L、0.003125mmol/L

### 2、操作表:

	空白孔	标准孔
双蒸水 (mL)	0.16	
不同浓度亚硝酸钠标准液 (mL)		0.16
显色剂 (mL)	0.08	0.08

混匀, 静置 15 分钟, 波长 550nm, 酶标仪测定各孔吸光度 A 值

### 3、测定结果

标准品浓度 (μmol/L)	测定 OD 值	绝对 OD 值
0	0.0406	0
3.125	0.0975	0.0569
6.25	0.1581	0.1175
12.5	0.2766	0.2360
20	0.4117	0.3711
25	0.4957	0.4551
50	0.9523	0.9117

### 4、绘制图表:

