

一氧化氮（NO）测定试剂盒说明书(精简版)

（货号：A012-1 硝酸还原酶法）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预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、测定原理：

NO 化学性质活泼,在体内代谢很快转为 NO₂⁻和 NO₃⁻,而 NO₂⁻又进一步转化为 NO₃⁻,本法利用硝酸还原酶特异性将 NO₃⁻还原为 NO₂⁻,通过显色深浅测定其浓度的高低。

二、试剂的组成与配制（试剂盒有效期 3 个月）：

试剂组成	25 管/24 样 货号:A012-1-1	50 管/48 样 货号:A012-1-2	保 存
试剂一	液体 6mL×1 瓶	液体 6mL×2 瓶	-20℃以下
试剂二	液体 6mL×1 瓶	液体 6mL×2 瓶	-20℃以下
混合试剂的配制：按试剂一：试剂二=1：1 配制，充分混合后待用，用多少配多少，现用现配			
试剂三	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	4℃
试剂四	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	4℃
试剂五	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光
	用时每支粉剂加双蒸水 10mL,加热到 95℃左右充分溶解	用时每支粉剂加双蒸水 20mL,加热到 95℃左右充分溶解	室温避光
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光
	用时加双蒸水 4mL 室温溶解，颜色变成深咖啡色不可再用	用时加双蒸水 8mL 室温溶解，颜色变成深咖啡色不可再用	4℃避光
试剂七	液体 4mL×1 瓶	液体 8mL×1 瓶	室温
显色剂的配制：按试剂五：试剂六：试剂七=2.5：1：1 配。需多少配多少。若在一个月内用完也可一次配成，剩余显色剂室温避光保存。天冷会有结晶析出，再次使用时，放 100℃水浴溶解后使用。			
标准品 (10mmol/L)	0.5mL×1 支	0.5mL×1 支	-20℃以下
	100μmol/L 标准品应用液的配制：取 50μL 10mmol/L 标准液用双蒸水定容稀释至 5mL（即 100 倍稀释），充分混匀，现用现配。		
双蒸水	40mL×1 瓶	40mL×2 瓶	4℃

[注]：试剂五为过饱和溶液，所以在配制时最好边加热边用玻璃棒搅拌，以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能仍有结晶，用之前可以再次加热使其溶解。(加热时可隔水加热：取干净的小烧杯或试剂瓶倒入试剂五粉剂，再加双蒸水，再将此小烧杯或试剂瓶放在 90-100℃的水浴锅中，注意千万别把小烧杯或试剂瓶弄翻（可在烧杯或试剂瓶周围用金属物或小石头固定，防止侧翻）)

三、所需仪器耗材及试剂：

含 550nm 波长的分光光度计及 0.5cm 光径比色皿（或酶标仪及 96 孔板）、37℃水浴锅、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）。

四、测定意义：

NO 化学性质活泼，体内代谢转化为硝酸盐（NO₃⁻）和亚硝酸盐（NO₂⁻），血清（NO₃⁻）与（NO₂⁻）浓度之和（NO₃⁻+NO₂⁻）才能准确代表体内 NO 水平。血清（NO₃⁻+NO₂⁻）含量测定，国内有的单位采用金属镉还原法，但该方法操作繁琐（血清需除蛋白），反应不易控制（金属镉可将 NO₂⁻进一步还原），且不能完全将 NO₃⁻还原为 NO₂⁻，准确性差。

本测试法为一种灵敏、简便、快速、稳定、易推广的方法。

五、操作步骤：

（一）、血清、胃液、尿液、细胞培养液等标本的检测前处理。

请参照《实验方法学》：

1、操作表：

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.1		
100μmol/L 标准品应用液 (mL)		0.1	
样本 (mL)			0.1
混合试剂 (mL)	0.4	0.4	0.4
混匀，37℃孵育 60 分钟			
试剂三 (mL)	0.2	0.2	0.2
试剂四 (mL)	0.1	0.1	0.1
充分旋涡混匀 30 秒，室温静置 40 分钟，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清显色。			
上清(mL)	0.5	0.5	0.5
显色剂 (mL)	0.6	0.6	0.6
混匀，室温静置 10 分钟，波长 550nm，光径 0.5cm，双蒸水调零，测定各管吸光度值 A。			

注：取上清时，如果上清量不够，请延长离心时间，或者少取一点。例如：可取 0.4 或 0.45mL，但您同一批实验所有的管子都应取上清的量要一致，千万不可将沉淀吸上。

2、计算公式：

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

C_{标准}:标准液浓度, 100μmol/L;

N: 样本测试前稀释倍数。

（二）、组织样本的检测前处理，请参照本公司官网“技术支持”：

1、操作表：

	空白管	标准管	测定管
双 蒸 水 (mL)	0.5	0.4	
100μmol/L 标准应用液(mL)		0.1	
样本 (mL)			0.5
混合试剂 (mL)	0.4	0.4	0.4
混匀，37℃孵育 60 分钟			
试剂三 (mL)	0.2	0.2	0.2
试剂四 (mL)	0.1	0.1	0.1
充分旋涡混匀 30 秒，室温静置 40 分钟，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清显色。			
上清(mL)	0.8	0.8	0.8
显色剂 (mL)	0.6	0.6	0.6
混匀，室温静置 10 分钟，波长 550nm，光径 0.5cm，双蒸水调零，测定各管吸光度值 A。			

2、计算公式：

$$\text{组织NO含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{gprot}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr 或}$$

$$\text{组织NO含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g组织}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

C_{标准}:标准品浓度，20μmol/L（因为标准管中加入 0.4mL 双蒸水和 0.1mL 的 100μmol/L 标准液，相当于 5 倍稀释所以此处标准浓度为 20μmol/L）；

Cpr: 匀浆液蛋白浓度，gprot/L（prot 指蛋白）；

W: 样本质量，g；

V_{样总}: 组织样本匀浆时，匀浆液的总体积，L。

六、最佳参考取样量：

1、牛和羊血清取 300μL，兔和鼠血清取 100μL；

2、10%组织匀浆一般取 500μL；

3、细胞悬液一般取 500μL，细胞培养液一般取 100μL。

七、正常参考值：

样本	参考取样量	参考值
大鼠血清	100μL	38.0±23.4μmol/L
小鼠血清	100μL	49.96±23.76μmol/L
兔血清	100μL	99.16±39.5μmol/L
狗血清	100μL	89.51±32.13μmol/L

八、注意点:

- 1、因组织中 NO 含量较少,组织匀浆一般为 10%或 20%,且做好的组织匀浆离心速度为 2500 转/分,离心 10 分钟,转速不可过高,时间不可太长,样本取样量较大,以 0.3~0.5mL 左右为宜。
- 2、试剂一、试剂二和标准避免反复冻融,如果需要分批实验(3 次以上),可以在第一次实验时将试剂一、试剂二和标准分装后再保存,根据每次实验时的试剂用量取出待用。配好的显色剂避光保存。
- 3、血清(浆)、组织等标本如不马上检测,应放于-70℃以下保存,半年内有效。
- 4、所有配试剂的双蒸水和空白管中加的双蒸水均要用不含 NO₂ 的双蒸水或三蒸水。(试剂盒中配有双蒸水)
- 5、在样本与底物反应完毕后,离心,取上清时千万不可将沉淀吸出,否则吸光度会增高很多,明显影响结果的真实性。
- 6、试管的选择:
 - ①、用一次性塑料试管或离心管;
 - ②、若用玻璃管,清洗如下:先用洗涤剂泡半个小时以上,煮 0.5-1 个小时,洗刷后,用自来水冲洗 15-20 遍,甩干,双蒸水冲洗 1-2 遍,烘干。