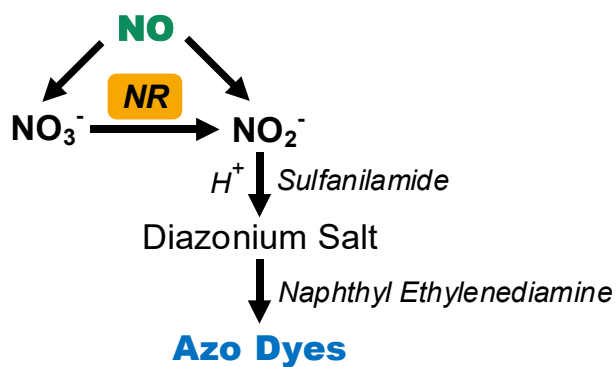




一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (硝酸还原酶法)

Nitric Oxide (NO) Content Assay Kit (Nitrate Reductase Method)



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (硝酸还原酶法)

Nitric Oxide (NO) Content Assay Kit (Nitrate Reductase Method)

一、产品描述

一氧化氮广泛分布于生物体内各组织中，是一种强活性的自由基气体，具有脂溶性、易扩散和生物活性高等特点，可作为新型递质和信息传递分子，在细胞间及细胞内发挥信号传递的作用，参与和调控多种生理过程。一氧化氮极易与活性氧结合被氧化，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 NO_2^- 和 NO_3^- ，通过硝酸还原酶将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ， NO_2^- 在酸性条件下与重氮盐磺胺生成重氮化合物，再与萘基乙烯基二胺偶合，产物在 550 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可定量检测总 NO 的含量。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液		液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一		粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1.8 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 2 周，避免反复冻融)
试剂二		粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂三		粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 550 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 2 周，避免反复冻融)
试剂四		液体 1.5 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂五		液体 25 μL ×1 支	4°C 避光保存	-
试剂六	组分 A	液体 6 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
	组分 B	液体 6 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂七		粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 15 mL 蒸馏水充分溶解 (超声促溶或 50°C 水浴溶解后使用)
标准液		液体 1 mL×1 支	4°C 保存	10 $\mu\text{mol/mL}$ 亚硝酸钠标准液
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 亚硝酸钠标准液使用蒸馏水稀释至 0.2、0.15、0.08、0.04、0.02、0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。				

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.2 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液即为待测样本，置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL) 为（500-1000）: 1 的比例（建议 1000 万个细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清液即为待测样本，置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 550 nm。

②试剂二应用液的制备（现用现配）：使用前根据使用量按试剂二：蒸馏水=1:59 的体积比配制。

③试剂五应用液的制备（现用现配）：使用前根据使用量按试剂五：蒸馏水=1:45 的体积比配制。

④试剂六应用液的制备（现用现配）：使用前根据使用量按组分 A：组分 B=1:1 的体积比配制。

⑤标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 亚硝酸钠标准液使用蒸馏水稀释至 0.2、0.15、0.08、0.04、0.02、0.01 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	10	1.0	0.2	0.2	0.08	0.04	0.02
标准液体积 (μL)	100	200	750	400	500	500	500
蒸馏水体积 (μL)	900	800	250	600	500	500	500
稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	1.0	0.2	0.15	0.08	0.04	0.02	0.01

⑥在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
待测样本	60	-	-
标准稀释液	-	60	-
蒸馏水	-	40	100
试剂一	5	-	-
试剂二应用液	10	-	-
试剂三	5	-	-
充分混匀，37°C准确反应 2 h (标准管、空白管不进行此步反应)			
试剂四	10	-	-
试剂五应用液	10	-	-
充分混匀，37°C准确反应 30 min (标准管、空白管不进行此步反应)			
试剂六应用液	100	100	100
充分混匀，室温静置 10 min			

注：若待测样本离心后仍呈现浑浊状态，可直接加入体系进行反应，测定管在反应完成后需加入 50 μL 试剂七（澄清剂）充分混匀，室温静置澄清 5 min，8000 g 常温离心 10 min，取上清液测定吸光值即可，标准管和空白管需按照相同步骤操作。

吸光值测定：测定 550 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：各浓度标准组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.2、0.15、0.08、0.04、0.02、0.01 μmol/mL 为横坐标 (x)，以其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x (μmol/mL)。

3.一氧化氮 (NO) 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/mg prot)} = \frac{x \times D}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/g)} = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times D}{W} = \frac{x \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times D}{\text{细菌或细胞数量}} = \frac{x \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = x \times D$$

注释： V 样总：待测样本总体积：1 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计，若 1000 万细菌或细胞则代入 1000 即可；D：待测样本稀释倍数，若未稀释则为 1。

四、注意事项

①若ΔA 测定>0.6，建议将待测样本使用提取液适当稀释后再进行测定；若ΔA 测定<0.02，建议制备更高浓度的样本再进行测定，计算时相应修改；

②建议使用新鲜样本进行检测；若液体样本含有颜色时（550 nm 处具有吸收峰），则需添加对照管，即试剂六应用液使用相同体积蒸馏水代替，测定 A 对照，计算ΔA 测定=A 测定-A 对照即可；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

