

Total Nitric Oxide (NO) Content Assay Kit

总一氧化氮(NO) (硝酸还原酶法) 含量测定试剂盒 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL850A	总一氧化氮(NO) (硝酸还原酶法) 含量测定试剂盒 分光法	48T

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 NO_2^- 和 NO_3^- , 本试剂盒采用硝酸盐还原酶将 NO_3^- 还原成 NO_2^- , 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	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉末 ×2 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后 -20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	1mL×1 支	-20°C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°C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°C保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解。
试剂五	12mL×1 瓶	4°C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	12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉末 ×1 支	4°C保存	用天平称取 6.9mg 的标准品至新的离心管中, 再加 1mL 的蒸馏水溶解, 然后用蒸馏水稀释 1000 倍即 0.1μmol/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:

- 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- 8000rpm, 4°C离心 10min, 取上清水浴 (95-100°C) 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/细菌样本:

- 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°C离心 10min, 取上清液沸水 (95-100°C) 5min 后, 于 12000rpm 再离心 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/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



3. 液体样本:

若浑浊先离心取上清液检测,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

1. 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 530nm,蒸馏水调零。
2. 其余试剂于 37°C 预热 5min。
3. 试剂一和二和三可按照 40:20:10 比例配成混合液(一枪加 70μL 该混合液)(该混合液用多少配多少,现配现用)。
4. 在离心管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (做一次)	空白管 (做一次)
试剂一	40	40	40
试剂二	20	20	20
试剂三	10	10	10
样本	120	-	-
标准品	-	120	-
蒸馏水	-	-	120
混匀, 37°C 反应 60min			
试剂四	80	80	80
混匀, 37°C 反应 60min			
反应 mix	400	400	400
混匀, 37°C 避光反应 15min, 全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中, 于 530nm 处读取吸光值 A。			

- 【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,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: 120μL 样本+150μL 蒸馏水+400μL 的反应 mix,混匀,37°C 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 后,取出全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中于 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:

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D$$

$$= 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL

C 标准---0.1μmol/mL

W---样品质量, g

V1---反应中样品体积, 0.12mL

500---细胞数量, 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。

有效期:

-20°C 保存三个月。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。

