

一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒说明书 (酶法测定总 NO)

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1475

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四	液体 1.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂五	液体 25μL×1 支	2-8℃保存
显色液 A 液	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液 B 液	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
澄清剂	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 1.8 mL 蒸馏水，-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二：临用前加入 1mL 蒸馏水，-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二工作液：临用前根据样本量按试剂二：蒸馏水=10μL：590μL（60T）的比例配制，当天用完；
- 4、试剂三：临用前加入 550μL 蒸馏水溶解，-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
- 5、试剂五：临用前根据样本数量按照试剂五：蒸馏水=5μL：225μL（23T）的比例配制试剂五溶液，现用现配；
- 6、显色液：临用前根据样本数量按照显色液 A 液：显色液 B 液=1:1 充分混匀，现配现用；
- 7、澄清剂：临用前加入 6mL 蒸馏水，可震荡或 50℃加热促进溶解。此溶液为饱和溶液，取上清使用即可。2-8℃可保存 12 周；
- 8、标准液：10μmol/mL 亚硝酸钠。临用前取 20μL 10μmol/mL 标准液，加入 380μL 蒸馏水，配制成 0.5μmol/mL 标准液，再取 0.5μmol/mL 标准液 50μL 和蒸馏水 450 μL 混合配制成 0.05μmol/mL 标准溶液。

产品说明：

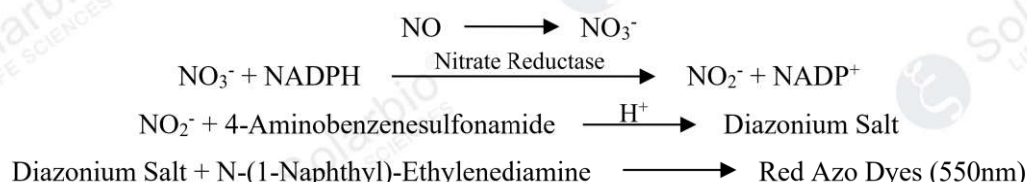
一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 是一种极不稳定的生物自由基，分子小，结构简单，常温下为气体，微溶于水，具有脂溶性，可快速透过生物膜扩散，作为一种新型的生物信使分子，在细胞间及细胞内发挥传递信号的作用。其广泛分布于生物体内各组织中，特别是神经组织中。在机体神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统也起着十分重要的作用。

NO在体内或水溶液中极易氧化生成NO₂⁻和NO₃⁻，本法利用硝酸还原酶特异性将NO₃⁻还原成NO₂⁻，在酸性条件下，NO₂⁻与重氮盐磺胺生成重氮化合物，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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、分析天平、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/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

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 比例加入提取液（建议称取 0.2g 样本，加入 1.0mL 提取液），冰浴匀浆后，于 4℃，12000rpm，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌/细胞样本：按细菌/细胞数量（10⁴）：提取液体积（mL）500~1000 : 1 的比例加入提取液（建议 1000 万细菌/细胞加入 1.0mL 提取液），冰浴超声破碎细菌/细胞（功率 200w，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min），然后于 4℃，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。若液体有浑浊则离心取上清测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 操作表：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	60	-	-
0.05μmol/mL标准液	-	60	-
蒸馏水	-	40	100
试剂一	5	-	-
试剂二工作液	10	-	-
试剂三	5	-	-
混匀，37℃反应120min		-	-
试剂四	10	-	-
试剂五	10	-	-
混匀，37℃反应30min		-	-
显色液	100	100	100
混匀，常温静置10min，于550nm处测定各管吸光值，分别记为A测定、A标准和A空白，计算ΔA测定=A测定-A空白，ΔA标准=A标准-A空白。空白管和标准管只需测1-2次。			

三、NO 含量计算



1. 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

3. 按细菌/细胞数量计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times N \div V_{\text{样总}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

4. 按液体体积计算

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标: 标准管浓度, 0.05 $\mu\text{mol}/\text{mL}$; V样: 加入样本体积, 0.06mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌/细胞总数, 以 10^4 计。

注意事项:

- 1、如果样本匀浆液离心后上清仍旧浑浊, 可直接进行反应, 反应后在 200 μL 反应液中加入 50 μL 澄清剂, 混匀后静置 5min, 离心后取 200 μL 上清测定, 这种情况下需将空白管和标准管进行相同处理。
- 2、如果 ΔA 测定小于 0.005 或测定管吸光值接近空白管, 可以增加样本量后再进行测定; 如果 ΔA 测定大于 0.6, 建议将样本上清用提取液适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。
- 3、如果样本上清有颜色 (在 550nm 下有吸收峰), 则需要补测样本的对照管, 即将显色液用相同体积的蒸馏水代替。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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$, $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。此时试剂盒规格为 100T/48S。

实验实例:

1. 取0.107g玉兰叶片样本, 加入1mL提取液进行冰浴匀浆, 离心后取上清, 按照测定步骤操作, 用96孔板测得计算: $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.172 - 0.045 = 0.127$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.526 - 0.045 = 0.481$, 按样本质量计算得:
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.05 \times 0.127 \div 0.481 \div 0.107 = 0.123 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。
2. 取0.0868g小鼠心脏样本, 加入1mL提取液进行冰浴匀浆, 离心后取上清, 按照测定步骤操作, 用96孔板测得计算: $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.187 - 0.045 = 0.142$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.526 - 0.045 = 0.481$, 按样本质量计算得:
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.05 \times 0.142 \div 0.481 \div 0.0868 = 0.170 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。
3. 取60 μL 牛血清样本, 按照测定步骤操作, 用96孔板测得计算: $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.326 - 0.045 = 0.281$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.526 - 0.045 = 0.481$, 按液体体积计算得:
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.05 \times 0.281 \div 0.481 = 0.029 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Baz L, Algarni S, Al-Thepyani M, Aldairi A, Gashlan H. Lycopene Improves Metabolic Disorders and Liver Injury Induced by a High-Fat Diet in Obese Rats. *Molecules*. 2022 Nov 10;27(22):7736. doi: 10.3390/molecules27227736. PMID: 36431836; PMCID: PMC9699056.





- [2] Huang C, Cao H, Qin J, Xu L, Hu F, Gu Y, Dou C, Zhang S. Ubiquitin-Specific Protease 14 (USP14) Aggravates Inflammatory Response and Apoptosis of Lung Epithelial Cells in Pneumonia by Modulating Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1). *Inflammation*. 2021 Oct;44(5):2054-2064. doi: 10.1007/s10753-021-01482-3. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34085162.
- [3] Li S, Wu L, Ma M, Yang L, Qin C. MicroRNA-668-3p regulates oxidative stress and cell damage induced by A β 1-42 by targeting the *OXR1*/p53-p21 axis. *Ann Transl Med*. 2022 Sep;10(17):928. doi: 10.21037/atm-22-3598. PMID: 36172098; PMCID: PMC9511202.

参考文献:

- [1] Green LC, Wagner DA, Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids[J]. *Analytical Biochemistry*, 1982, 126(1): 131-138.
- [2] Thomsen LL, Ching LM, Baguley BC. Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xanthone-4-acetic acid [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 1990, 50(21): 6966-6970.

相关系列产品:

- BC0080/BC0085 硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒
- BC1480/BC1485 水土中亚硝酸盐含量检测试剂盒
- BC1490/BC1495 食品中亚硝酸盐含量检测试剂盒

