

一氧化氮（NO）含量检测试剂盒说明书（化学法）

微量法

货号：BC5485

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 瓶	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
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

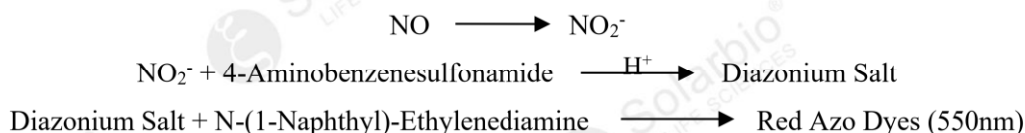
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 6mL 蒸馏水，可 50℃助溶，2-8℃可保存 12 周。冷却至常温使用；
- 2、显色液：临用前根据样本数量按照显色液 A 液：显色液 B 液=50μL: 50μL（100μL，1T）的比例配制显色液，充分混匀，现配现用；
- 3、标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠。
- 4、0.05μmol/mL 标准溶液的配制：取 50μL 10μmol/mL 亚硝酸钠，加入 950μL 蒸馏水，配制浓度为 0.5 μmol/mL；再取 100μL 0.5μmol/mL 亚硝酸钠和 900μL 蒸馏水混匀配制成 0.05 μmol/mL 的标准溶液备用。

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、泌尿生殖等系统中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⁻。在酸性条件下，NO₂⁻与重氮盐磺胺胺生成重氮化合物，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、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）2~5:10 的比例加入提取液（建议称取 0.2g 样本，加入 1.0mL 提取液），冰浴匀浆后，于 4℃，10000g，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）1000~2000:1 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℃，10000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
3. 血清（血浆）等液体样本：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. 在1.5mL EP管按下表顺序加样：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
蒸馏水	-	-	100
标准品	-	100	-
样本	100	-	-
试剂一	50	50	50
充分混匀，常温静置5min，于4℃，10000g离心5min，取上清			
上清液	100	100	100
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

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

2. 按样本质量计算

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

3. 按细菌/细胞数量计算

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

4. 按液体体积计算

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

C标：标准管浓度，0.05μmol/mL；V样：加入样本体积，0.1mL；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10⁴计。

注意事项：

- 1、如果ΔA 测定小于 0.005，可以增加样本量后再进行测定；如果ΔA 测定大于 0.7，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。
- 2、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 ΔA 标准=A 标准-A 空白，ΔA 测定=A 测定-A 对照。此时试剂盒规格为 100T/48S。



实验实例：

1. 取0.203g合欢叶片样本，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： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.082 - 0.047 = 0.035$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.402 - 0.047 = 0.355$ ，按样本质量计算得：
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.0243 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
2. 取0.215g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： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.102 - 0.047 = 0.055$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.402 - 0.047 = 0.355$ ，按样本质量计算得：
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.0360 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
3. 取100 μL 人血清样本，按照测定步骤操作，用96孔板测得计算： $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.071 - 0.047 = 0.024$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.402 - 0.047 = 0.355$ ，按液体体积计算得：
 $\text{NO含量} (\mu\text{mol/mL}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.0034 \mu\text{mol/mL}$ 。

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 xanthenone-4-acetic acid [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1990, 50(21): 6966-6970.
- [3] Yang Wenping, Li Junmin, Wang Jinwen. Comparison of determination methods of serum nitric oxide content[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2002, 20(03): 147-148.

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
- BC1470/BC1475 一氧化氮（NO）含量检测试剂盒（酶法测总NO）
- BC2990/BC2995 亚硝酸还原酶（NiR）活性检测试剂盒

