

一氧化氮 (NO) 含量测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

一氧化氮 (NO) 广泛分布于生物体内, 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硝酸盐和亚硝酸盐, 本试剂盒采用硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐, 然后与改良的 Griess Reagent 反应生成在 530nm 处有特征吸收峰的可色物质, 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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体×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	液体 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 μL×2 支	-20°C保存	第一次开启前务必离心使微量液体落入底部 (避免试剂浪费), 若一次性用不完, 可分装保存, 避免反复冻融。
试剂四	粉体 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	临用前, 可依据待检测样本数量, 把试剂五和六按照等比例混合成无色的反应 mix (注意观察, 若变粉色, 则不能使用)。两天之内用完。
试剂六	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体×1 支	4°C保存	用天平称取 6.9mg 的标准品至一新 EP 管中, 再加 1mL 蒸馏水溶解即 100 μmol/mL, 再用蒸馏水稀释 1000 倍即 0.1 μmol/mL, 现配现用。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、研钵或匀浆器。

四、一氧化氮 (NO) 含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4°C×8000 rpm, 离心 10min, 取上清液沸水 (95-100°C) 5min 后, 于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清, 上清置冰上待测。

【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 500 万细菌或细胞加入 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); 4°C×8000 rpm, 离心 10min, 取上清液沸水 (95-100°C) 5min 后, 于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清,

上清置冰上待测。

【注】:若增加样本量,按照细菌/细胞数量(10⁴个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

- ③ 液体样本:若浑浊先离心取澄清上清液液体检测,若是澄清液体直接检测即可(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)。

2、上机检测:

- 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。在EP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30min			
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,ΔA=A测定-A空白。			

- 【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,则改变后的样本质量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,ΔA=A测定-A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,测定管和空白管都取出全部上清液至1mL玻璃比色皿中于530nm处读取吸光值A。

五、结果计算:

- 1、按样本质量计算:

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = (\text{C标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A标准} - \text{A空白}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \\ = 0.1 \times \Delta A \div (\text{A标准} - \text{A空白}) \div \text{W} \times \text{D}$$

- 2、按细胞/细菌数量计算:

$$\text{NO含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = (\text{C标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A标准} - \text{A空白}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times 500) \times \text{D} \times 10^3 \\ = 0.2 \times \Delta A \div (\text{A标准} - \text{A空白}) \times \text{D}$$

- 3、按液体体积计算:

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = (\text{C标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A标准} - \text{A空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ = 0.1 \times \Delta A \div (\text{A标准} - \text{A空白}) \times \text{D}$$

C标准---0.1μmol/mL;

V---加入提取液体积,1mL;

V1---反应中样品体积,0.12mL;

W---样品质量,g;

500---细胞数量,万;

D---稀释倍数,未稀释即为1。