

一氧化氮（NO）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1074

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

检测范围：1μM-100μM

灵敏度：1μM

适用样本：动植物组织、细胞、血清（浆）、尿液（或其他生物体液）

产品简介

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，可快速透过生物膜扩散，作为一种新型的生物信使分子，在细胞间及细胞内传递信号，在机体的生理、病理过程中起着重要的作用。其广泛分布于生物体内神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统中，特别是神经组织中较丰富。NO 易被氧化成亚硝酸盐和硝酸盐，因此，通常要测定亚硝酸盐和硝酸盐的总量来推算出总的一氧化氮的量。本试剂盒采用改进的格里斯法将硝酸盐还原为亚硝酸盐后，即可准确测定 NO 的生成量。格里斯分析的机理概括为重氮类之间的偶氮耦合，重氮类是由磺胺和 NO_2^- 和 $\text{N}^-(1\text{-萘基})$ 乙二胺二盐酸盐产生的，产物在 540nm 处有特征吸收峰，测定其吸光值，可以计算 NO 含量。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃
试剂一	3mL	6mL	4℃，避光保存
试剂二	3mL	6mL	4℃，避光保存
试剂三	6mL	12mL	4℃，避光保存
试剂四	0.5mL	1mL	4℃，避光保存
标准品（1M NaNO_2 ）	1mL	1mL	-20℃，避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 540nm 处的吸光值）及恒温培养箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 保存。

试剂四：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 保存。

工作液的配制：每孔需要 200 μL 工作液，为避免损失，按 204μL 每孔体系配制：吸取 104 μL 试剂三，50 μL 试剂一和 50 μL 试剂二。工作液需现配现用。

产品说明书

标准曲线设置：取 10 μ L NaNO₂ 标准品（1M）用 990 μ L 提取液稀释至 10mM NaNO₂。取 10 μ L 10mM 的 NaNO₂ 用 990 μ L 提取液稀释至 100 μ M NaNO₂。用 100 μ M NaNO₂ 按下表所示，进行下一步稀释：

	100 μ M NaNO ₂ (μ L)	提取液 (μ L)	浓度 (μ M)
Std. 1	200	0	100
Std. 2	100	100	50
Std. 3	40	160	20
Std. 4	20	180	10
Std. 5	10	190	5
Std. 6	4	196	2
Std. 7	2	198	1
Blank	0	200	0

注意：标准品现配现用；稀释后的标准溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

样本制备

1. 动植物组织：称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴匀浆，14,000rpm，4℃离心 10min，取上清液进行脱蛋白处理。
2. 细胞：收集 500 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 14,000rpm，4℃离心 10min，取上清液进行脱蛋白处理。
3. 血清、血浆、尿液（和其他生物体液）：需要进行脱蛋白处理的样本进行脱蛋白处理以后用于检测，无需脱蛋白处理的样本直接检测。

脱蛋白处理：将 150 μ L 样品与 8 μ L 试剂四混合在 1.5ml EP 管中，旋涡，然后 14,000rpm，4℃离心 10min。将 100 μ L 的上清液转移到干净的 EP 管中，置冰上待测。

需要进行脱蛋白处理的样品包括血清、血浆、全血、含有 FBS 的细胞培养基、组织或细胞裂解物。尿液和唾液不需要脱蛋白。

注意：建议您使用新鲜样品，如果不立即实验，样品可在-80℃保存 6 个月。如果样品需要脱蛋白，则每个浓度标准品应制备 150 μ L，并同样用试剂四处理，避免结果计算中需要使用稀释因子。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 将 100 μ L 稀释后的标准品和样本添加到单独标记的 EP 管中。然后在每个样本和标准管中加入 200 μ L 工作液，混合均匀。
3. 将反应体系 37℃孵育 30min。
4. 对反应管进行短暂离心以去除不溶物，并将每个反应体系中分别取 200 μ L 液体转移到 96 孔板或微量玻璃比色皿中。在 540nm 处读取吸光值。空白孔（标准品 Blank）记为 A_空，标准孔记为 A_标，测定孔记为 A_测。计算 $\Delta A_{测} = A_{测} - A_{空}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标} - A_{空}$ 。

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。如果样本吸光值大于 1.4，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. NO 含量的计算

将样本的 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值（1 μ M=1nmol/mL）。

（1）按样本鲜重计算

$$\text{NO 含量 (nmol/g 鲜重)} = y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = y \div W \times n$$

产品说明书

(2) 按样本体积计算

$$\text{NO 含量 (nmol/mL)} = y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times n = y \times n$$

(3) 按细胞数目计算

$$\text{NO 含量 (nmol/10}^4 \text{ cells)} = y \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = y \div 500 \times n = 0.002y \times n$$

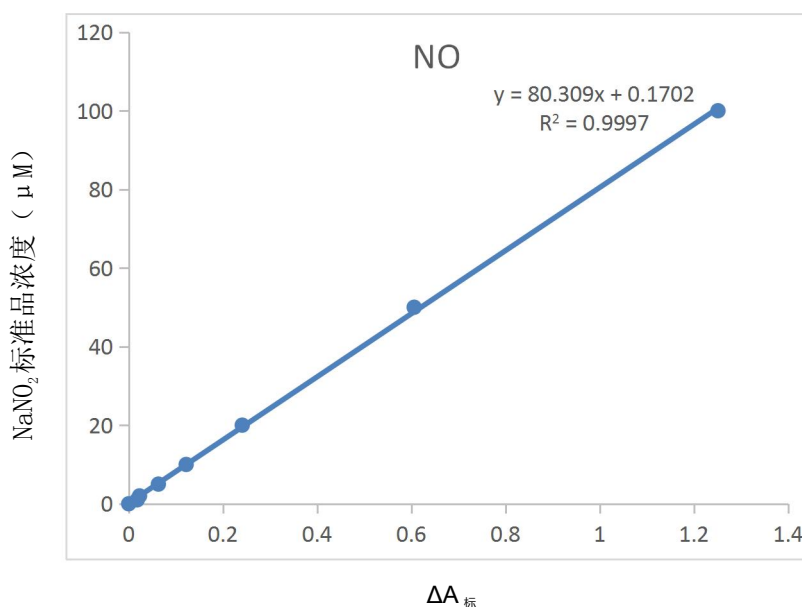
$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; n : 样本稀释倍数; 500: 细胞数量, 500 万。

换算: 1 mg/dL NO 相当于 333 μM , 0.001%或 10ppm。

注意: 抗氧化剂和亲核剂 (例如 β -巯基乙醇、谷胱甘肽、二硫苏糖醇和半胱氨酸) 可能会干扰检测。在样品制备过程中避免使用这些化合物。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1039 过氧化氢 (H₂O₂) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1046 脯氨酸 (PRO) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1090 半胱氨酸 (Cys) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

