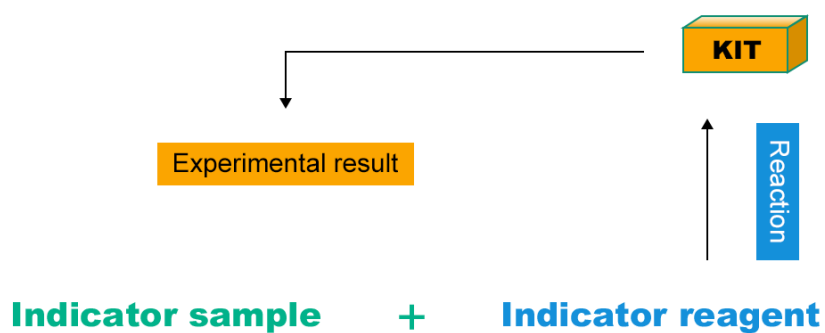


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0374

Size: 100T/48S

一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

NO (Nitric Oxide, NO) 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。它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。

二、测定原理:

NO在体内或水溶液中极易氧化生成 NO^{2-} , 在酸性条件下, NO^{2-} 与重氮盐磺酸胺生成重氮化合物, 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。为了排除样品色素等的影响, 每个样品需做对照管。

三、需自备的仪器和用品:

天平、研钵或匀浆器、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	

五、样品处理：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4℃，离心 15min，取上清置于冰上待测。
3. 体液和培养液等其它液态样品：直接测定。

六、测定步骤和操作表：

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm。

2、操作表

	对照管	测定管
样品（μL）	100	100
试剂一（μL）		50
试剂二（μL）	50	
试剂三（μL）	50	50
混匀，室温静置 15min，于微量石英比色皿/96 孔板，对照管调零，测定 550nm 处吸光值，记为 A 550 。		

七、NO 含量计算：

A、用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为： $y=0.016x-0.0103$ ， $R^2=0.9986$

1、组织样品：

NO含量定义：25℃时，每克样品或每毫克蛋白15min生成1 μmol NO²⁻，相当于1 μmol NO。

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{NO 含量 (}\mu\text{mol/g)} &= (A_{550} + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3} \\ &= 0.125 \times (A_{550} + 0.0103) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/mg prot)} = (A_{550} + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3}$$
$$= 0.125 \times (A_{550} + 0.0103) \div C_{\text{pr}}$$

2、其他样品：

NO 含量定义：25℃时，每升样品15min生成 $1 \mu\text{mol NO}^{2-}$ ，相当于 $1 \mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/L)} = (A_{550} + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 125 \times (A_{550} + 0.0103)$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样品体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； W ：样品质量，g； C_{pr} ：蛋白浓度，mg/mL

B、用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为： $y = 0.008x - 0.0103$ ， $R^2 = 0.9986$

1、组织样品：

NO含量定义：25℃时，每克样品或每毫克蛋白15min生成 $1 \mu\text{mol NO}^{2-}$ ，相当于 $1 \mu\text{mol NO}$ 。

(1) 按样本重量计算

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/g)} = (A_{550} + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3}$$
$$= 0.25 \times (A_{550} + 0.0103) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/mg prot)} = (A_{550} + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3}$$
$$= 0.25 \times (A_{550} + 0.0103) \div C_{\text{pr}}$$

2、细胞

NO 含量定义：25℃时，每 10^4 个细胞15min 生成 $1 \mu\text{mol NO}^{2-}$ ，相当于 $1 \mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol}/10^4\text{cell)} = (A_{550} + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$$
$$\times 10^{-3} = 0.25 \times (A_{550} + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

3、其他样品：

NO 含量定义：25℃时，每升样品 15min 生成 $1 \mu\text{mol NO}^{2-}$ ，相当于 $1 \mu\text{mol NO}$ 。

$$\text{NO 含量 (}\mu\text{mol/L)} = (A_{550} + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 250 \times (A_{550} + 0.0103)$$

V反总：反应总体积，0.2mL；V 样：反应中样品体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样品质量，g；Cpr：蛋白浓度，mg/mL

八、注意事项：

1. 试剂盒 2-8℃保存。
2. 尽量使用新鲜样品进行检测，试剂三有腐蚀性，操作时请做好防护措施。
3. 若检测出得 OD 值在标准曲线范围外，请将样品进行适当的浓缩或稀释，并在计算公式中除以浓缩倍数或者乘以稀释倍数。

最低检出限为 0.65 μ mol/L。