

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 含量测定试剂盒说明书

### 微量法

**注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。**

#### 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。

#### 测定原理：

NO在体内或水溶液中极易氧化生成  $\text{NO}^2$ ，在酸性条件下， $\text{NO}^2$ 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。为了排除样品色素等的影响，每个样品需做对照管。

#### 自备实验用品及仪器：

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。

#### 试剂组成和配制：

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	-

#### 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 ( $10^4$ 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。

#### 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。

## 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°C 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

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

#### 2、其他样品:

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

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

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

### 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°C 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

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

##### (2) 按样本蛋白浓度计算

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

#### 2、细胞

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

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

#### 3、其他样品:

NO 含量定义: 25°C 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

## 注意事项:

1. 试剂盒 2-8°C 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。
4. 最低检出限为  $0.65 \mu\text{mol/L}$ 。