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 处有特征吸收峰的有色物质，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℃保存	
试剂一	粉体×2 支	-20℃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℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体 1mL×1 支	-20℃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℃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℃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℃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℃保存	
标准品	粉体×1 支	4℃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 100μmol/mL，再用蒸馏水稀释 1000 倍即 0.1μmol/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）、水浴锅、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℃×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100℃）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℃×8000 rpm，离心 10min，取上清液沸水（95-100℃）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（10^4 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 试剂可于 37℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 40:20:10 比例配成混合液（一枪加 70μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。

④ 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℃反应 60min			
试剂四	80	80	80
混匀，37℃反应 30min			
反应 **mix**	400	400	400
混匀，37℃**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，△A=A 测定-A 空白。			

【注】1. **若△A 小于 0.01，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℃避光反应 15min，于 530nm 处读取吸光值 A，△A=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：

NO 含量(μmoL/g 鲜重)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×W)×D

=0.1×△A÷(A 标准-A 空白)÷W×D

2、按细胞/细菌数量计算：

NO 含量(nmoL/10^4 cell)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×500)×D×10^3

=0.2×△A÷(A 标准-A 空白)×D

3、按液体体积计算：

NO 含量(μmoL/mL)=(C 标准×V1)×△A÷(A 标准-A 空白)÷V1×D

=0.1×△A÷(A 标准-A 空白)×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。