

凯基一氧化氮检测试剂盒（硝酸还原酶法）

说明书修订日期：2015. 07. 13

Cat number: KGT00725-KGT00750

Store at -20℃ for for six months

For Research Use Only（科研专用）

一、实验原理

一氧化氮(Nitric Oxide, NO), 是一种非常重要的生理性的细胞内及细胞间的信号分子, 在免疫、神经及循环等系统中起着重要作用。一氧化氮化学性质活泼, 体内代谢转化为硝酸盐 (NO_3^-) 和亚硝酸盐 (NO_2^-), 此两种浓度之和 ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) 才能准确代表 NO 水平。本法利用硝酸还原酶特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 通过显色反应测定其浓度的高低。本测试法灵敏、简便且较稳定, 可用于血清、组织匀浆、细胞及细胞培养液、腹水、胸水、脑脊液、胃液、尿液等样本的 NO 浓度测定。

二、试剂盒组份

组份	KGT00725 25 assays	KGT00750 50 assays	保存条件
Buffer A	6 mL	6 mL×2	-20℃, 3 个月
Buffer B	6 mL	6 mL×2	-20℃, 3 个月
Buffer C	6 mL	12 mL	室温, 6 个月
Buffer D	3 mL	6 mL	室温, 6 个月
粉剂 E	1 支	1 支	4℃, 避光
粉剂 F	1 支	1 支	4℃, 避光
Buffer G	4 mL	8 mL	室温, 6 个月
标准品 (10mmol/L)	0.5 mL	0.5 mL	-20℃, 6 个月

注意事项

- 混合试剂的配制: 按 Buffer A: Buffer B=1: 1 配制, 用多少配多少, 配好后充分混合后待用, 现用现配, 24 小时内有效。Buffer A, Buffer B 在 -20℃ 以下可以保存 3 个月, 使用前请放 37℃ 水浴或室温使其溶解后再用。
- 粉剂 E 工作液配制:
25 assays: 将粉剂加入 90~100℃ 热双蒸水 10 mL 中, 隔水加热充分溶解; 4℃ 避光保存;
50 assays: 将粉剂加入 90~100℃ 热双蒸水 20 mL 中, 隔水加热充分溶解; 4℃ 避光保存。
[注]:试剂 E 为过饱和溶液, 所以在配制时最好用 90~100℃ 热蒸馏 13ml(25assays)/23ml(50assays) (热胀冷缩) 边隔水加热边用玻璃棒搅拌, 以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能仍有结晶, 用之前可以再次边隔水加热边玻璃棒搅拌使其溶解。
- 粉剂 F 工作液配制:
25 assays: 将试剂加入双蒸水 4 mL 中溶解后备用; 4℃ 避光保存 (如颜色变为深咖啡色不可再用)。
50 assays: 将试剂加入双蒸水 8 mL 中溶解后备用; 4℃ 避光保存 (如颜色变为深咖啡色不可再用)。
- 显色剂配制: 试剂 E 工作液: 试剂 F 工作液: Buffer G=2.5: 1: 1。若能在一个月内用完者也可一次配成。剩余显色剂避光保存。室温较低时会有结晶析出, 再次使用时, 放 100℃ 水浴, 反复摇动溶解后使用。
- 100μmol/L 标准工作液配制: 取 0.1 mL 标准品 (10mmol/L) 用双蒸水定容稀释至 10mL (即 100 倍稀释), 混匀, 即为 100μmol/L 标准应用液, 现用现配。

三、操作步骤

(一)、血清、尿液、胃液、细胞培养液等样本检测

1. 操作表:

试剂	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.1		
100 μ mol/L 标准工作液 (mL)		0.1	
样本 (mL)			0.1
混合试剂 (mL)	0.4	0.4	0.4

混匀, 37 $^{\circ}$ C 准确水浴 60min

Buffer C (mL)	0.2	0.2	0.2
Buffer D (mL)	0.1	0.1	0.1

充分旋涡混匀 30 秒, 室温静置 40 分钟, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清显色。

上清 (ml)	0.5	0.5	0.5
显色剂 (mL)	0.6	0.6	0.6

混匀, 室温静置 10 分钟, 蒸馏水调零, 550nm, 0.5cm 光径, 测各管吸光度值。

注意: 1、室温较低时, 所有的试剂均应置于 37 $^{\circ}$ C 预热 5 分钟。

2、取上清时, 如果上清量不够, 请延长离心时间, 或者少取一点。例如: 可取 0.4 或 0.45ml, 但您同一批实验所有的管子都应取上清的量要一致, 千万不可将沉淀吸上。

2. 计算公式:

$$NO \text{ 含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度}(100\mu\text{mol/L}) \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

3. 计算举例:

①、取大鼠血清 0.1ml 进行检测, 结果如下: 空白管吸光度为 0.021, 标准管吸光度为 0.118, 测定管吸光度为 0.045, 血清为进行稀释, 稀释倍数为 1。则计算结果为:

$$NO \text{ 含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{0.045 - 0.021}{0.118 - 0.021} \times 100\mu\text{mol/L} \times 1 = 24.742\mu\text{mol/L}$$

②、取胃液 5 倍稀释后, 取 0.1ml 进行检测, 结果如下: 空白管吸光度为 0.022, 标准管吸光度为 0.124, 测定管吸光度为 0.097, 胃液的稀释倍数为 5。则计算结果为:

$$NO \text{ 含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{0.097 - 0.022}{0.124 - 0.022} \times 100(100\mu\text{mol/L}) \times 5 = 367.6\mu\text{mol/L}$$

(二)、组织样本检测

1. 操作表:

试剂	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.5	0.4	
100 μ mol/L 标准应用液 (mL)		0.1	
样本 (mL)			0.5
混合试剂 (mL)	0.4	0.4	0.4

混匀, 37 $^{\circ}$ C 准确水浴 60min

Buffer C (mL)	0.2	0.2	0.2
---------------	-----	-----	-----

Buffer D (mL)	0.1	0.1	0.1
充分旋涡混匀 30 秒，室温静置 40 分钟，3500~4000 转/分，离心 10 分钟，取上清显色。			
上清 (ml)	0.8	0.8	0.8
显色剂 (ml)	0.6	0.6	0.6

混匀，室温静置 10 分钟，蒸馏水调零，550nm，0.5cm 光径，测各管吸光度值。

注意：1、室温较低时，所有的试剂均应置于 37℃ 预热 5 分钟。

2、取上清时，如果上清量不够，请延长离心时间，或者少取一点。例如：可取 0.4 或 0.45ml，但您同一批实验所有的管子都应取上清的量要一致，千万不可将沉淀吸上。

2. 计算公式：

$$NO \text{ 含量} (\mu \text{ mol/gprot}^*) = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度} (20 \mu \text{ mol} / L^{**}) \div \text{样本的蛋白含量} (\text{gprot} / L)$$

注：*： $\mu \text{ mol/gprot}^*$ 为微摩尔/克蛋白

**：因为标准管中加入 0.4ml 蒸馏水加 0.1ml 的 100 $\mu\text{mol/L}$ KNO_3 标准液，相当 5 倍稀释所以此处标准浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

3、计算举例：

取 10% 肝脏组织匀浆上清 0.5ml 按操作表进行检测，结果如下：空白管吸光度为 0.021，标准管吸光度为 0.111，测定管吸光度为 0.052，同时测得 10% 匀浆上清蛋白含量为 8.06gprot/L。则计算结果为：

$$NO \text{ 含量} (\mu \text{ mol/gprot}) = \frac{0.052 - 0.021}{0.111 - 0.021} \times 20 \mu \text{ mol} / L \div 8.06 \text{ gprot} / L = 0.85 \mu \text{ mol} / \text{gprot}$$

四、最佳参考取样量：

- 1、牛和羊血清取 300 μl ，兔和鼠血清取 100 μl ；
- 2、10% 组织匀浆一般取 500 μl ；
- 3、细胞悬液一般取 500 μl ，细胞培养液一般取 100 μl 。

五、正常参考值：

样本	参考取样量	参考值
大鼠血清	100 μl	38.0 \pm 23.4 $\mu\text{mol/L}$
小鼠血清	100 μl	49.96 \pm 23.76 $\mu\text{mol/L}$
兔血清	100 μl	99.16 \pm 39.5 $\mu\text{mol/L}$
狗血清	100 μl	89.51 \pm 32.13 $\mu\text{mol/L}$

注意事项：

- 1、因组织中 NO 含量较少，组织匀浆一般为 10% 或 20%，且做好的组织匀浆离心速度为 2000 转/分，离心 10 分钟，转速不可过高，时间不可太长，样本取样量较大，以 0.3~0.5ml 左右为宜。
- 2、Buffer A、Buffer B 和标准避免反复冻融，如果需要分批实验(三次以上)，可以在第一次实验时将 Buffer A、Buffer B 和标准分装后再保存，根据每次实验时的试剂用量取出待用。配好的显色剂避光保存。
- 3、血清（浆）、组织等标本如不马上检测，应放于 -70℃ 以下保存，半年内有效。
- 4、所有配试剂的蒸馏水和空白管中加的蒸馏水均要用不含 NO_2^- 的双蒸或三蒸水。

- 5、在样本与底物反应完毕后，离心，取上清时千万不可将沉淀吸出，否则吸光度会增高很多，明显影响结果的真实性。
- 6、试管的选择：
 - ①用一次性塑料试管（建议使用一次性塑料试管）；
 - ②若用玻璃管，清洗如下：先用洗涤剂泡半个小时以上，煮 0.5-1 个小时，洗刷后，用自来水冲洗 15-20 遍，甩干，蒸馏水冲洗 1-2 遍，烘干。
- 7、本试剂盒仅用于科研。

凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

细胞凋亡

一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase (2、3、6、8、9) 系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)
- TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒
- DNA Ladder 检测试剂盒

二、细胞凋亡相关抗体

三、凋亡诱导剂、抑制剂

四、氧化应激损伤检测试剂盒

五、细胞凋亡研究辅助试剂

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

细胞染色产品

亚细胞组分制备