

一氧化氮检测试剂盒（化学法）

说明书修订日期：2016.06.22

Cat number: KGT008

Store at 4℃ for for 6 months,避光

For Research Use Only（科研专用）

一、实验原理

一氧化氮 NO(即血管内皮舒张因子), 在生物体内作为一种反应性极强的自由基, 兼有第二信使和神经递质作用, 同时又是一种效应分子, 在体内具有广泛的生理作用, 如松弛血管平滑肌, 抑制血小板聚集, 调节血流, 介导细胞毒效应和免疫调节, 参与学习和记忆、动脉粥样硬化等作用。

NO 本身半衰期极短, 血液中的 NO 主要由血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、血小板、巨噬细胞等产生以硝酸盐的形式存在, 通过其浓度可以间接测知 NO 浓度。

NO 遇氧及水生成硝酸盐及亚硝酸盐, 后者遇硝酸盐显色剂可生成淡红色偶氮化合物, 通过比色可间接测知 NO 浓度。

二、试剂盒组份

组份	KGT008 (100 assays)	保存条件
Buffer A	100 mL	4℃
Buffer B	50mL	室温或 4℃
试剂 C	粉剂一支	4℃避光
试剂 D	粉剂一支	4℃避光
Buffer E	12mL	室温
亚硝酸钠标准液 (2mmol/L)	1 mL	4℃

注意事项

1. 试剂 C 工作液配制: 用时加入双蒸水至 30 mL, 4℃避光保存。(难溶, 可以 60℃隔水加热至溶解)
2. 试剂 D 工作液配制: 用时加入双蒸水至 12 mL, 4℃避光保存。
3. 显色剂配制: 试剂 C 工作液: 试剂 D 工作液: Buffer E=2.5: 1: 1 的体积比配制 (现配现用), 配好的显色剂放冰箱保存, 如颜色变得很深则不可再用。
4. 亚硝酸钠标准液 (20umol/L) 配制: 将亚硝酸钠标准液 (2mmol/L) 用双蒸水 100 倍稀释待用, 现用现配。

三、操作步骤

1. 操作方法:

于一次性塑料试管中按下表加入试剂

试剂	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	a *		
20μmol/L 亚硝酸钠标准液 (mL)		a *	
样本 (mL)			a *
Buffer A (mL)	0.8	0.8	0.8
Buffer B (mL)	0.4	0.4	0.4
混匀后室温放置 10 分钟, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, 取澄清的上清液			
上清液 (mL)	0.8	0.8	0.8
显色剂 (mL)	0.4	0.4	0.4

混匀, 15 分钟后, 550nm 比色, 0.5cm 光径比色杯, 水调零, 测各管 OD 值

注意事项 a * 为取样量=标准品量=蒸馏水量

四、计算

1. 计算公式

血清:

$$NO \text{ 含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{测定管OD值} - \text{空白管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}(20\mu\text{mol/L}) \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

组织:

$$NO \text{ 含量}(\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\text{测定管OD值} - \text{空白管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}(20\mu\text{mol/L}) \div \text{待测样本蛋白浓度}(gprot/L)$$

2. 计算举例

(1)兔血清测定管 OD 值为 0.018, 空白管 OD 值为 0.004, 标准管 OD 值为 0.024。

$$NO_2^- / NO_3^- = \frac{0.018 - 0.004}{0.024 - 0.004} \times 20\mu\text{mol/L} = 14\mu\text{mol/L}$$

(2)小鼠 10%脑组织测定管 OD 值为 0.012, 空白管 OD 值为 0.004, 标准管 OD 值为 0.023.10%小鼠脑匀浆蛋白浓度为 4.45gprot/L

$$NO_2^- / NO_3^- = \frac{0.012 - 0.004}{0.023 - 0.004} \times 20 \div 4.45 = 1.89\mu\text{mol/gprot}$$

3. 查标准曲线计算: 以测得的吸光度查坐标图上相对应浓度

标准曲线的制备: 按下表制备亚硝酸钠系列溶液。(带标准品, 标准曲线可以不做。)

相当于 NO 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	4	8	12	16	20
2mmol/L 亚硝酸钠标准液 (μL)	0	10	20	30	40	50
双蒸水 (μL)	5000	4990	4980	4970	4960	4950

每一浓度取 0.1ml 测定步骤进行, 以测得的吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 做标准曲线。

五、操作注意点

1. 严格按照操作规程。
2. 要用一次性塑料试管或用清洗十分干净的玻璃管。
3. 离心后的上层液一定要澄清, 若有混浊要再次离心。
4. 溶血及混浊血清对测定结果有影响。
5. 血清及组织块零下冷冻后可保存半月左右。温度越低保存时间越长。零上 4~5℃可保存三天。
6. 所有试剂配制均应在测试前一天配制, 目的使其充分溶解。在测试过程中, 第一次吸的试剂要丢弃, 样品和试剂要垂直加入试管, 不要加在管壁上(因试剂及样品量小)。离心前要用漩涡混匀器充分混匀, 至少放置 10 分钟以上。