

一氧化氮 (NO) 检测试剂盒说明书

(货号: BC004 微板法)

一、测定意义及原理

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, 调节脑血流, 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 产生异常与某些疾病的发生发展有着密切关系。因此, 近年来对 NO 的研究越来越受到广大医学科学工作者的重视。

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及亚硝酸盐的形式存在, 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、试剂组成及配制 (96T)

试剂一: 液体 20ml * 1 瓶, 4°C 保存一年。

试剂二: 液体 10ml*1 瓶, 4°C 保存一年。

试剂三: 液体 10ml* 1 瓶, 4°C 避光保存。

(过饱和溶液, 如有结晶析出, 60°C 以上加热溶解完全以后使用)

试剂四: 液体 3ml* 1 瓶, 4°C 避光保存。

试剂五: 液体 3ml* 1 瓶, 4°C 保存。

显色剂的配制: 试剂三: 试剂四: 试剂五=2.5 : 1 : 1, 现用现配, 配好的显色剂放冰箱保存, 颜色变得很深后不可再用。

2mmol/L 亚硝酸钠标准液: 1ml* 1 支, 4°C 保存。

20 μmol/L 亚硝酸钠标准液配制: 取 2mmol/L 亚硝酸钠标准液 0.1ml 加双蒸水定容到 10ml 即为 20 μmol/L 亚硝酸钠标准液, 现用现配。

三、操作过程:

1, 前处理:

血清 (浆): 取血清 (浆) 原液 100μl 加试剂一 200μl, 混匀, 加试剂二 100μl, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160μl 操作。

组织: 取 10%匀浆上清 300 μl 加试剂一 200μl, 混匀, 加试剂二 100μl, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160μl 操作。

2, 操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水 (ml)	0.16		
20 μmol/L 亚硝酸钠标准液 (ml)		0.16	
上清液 (ml)			0.16
显色剂 (ml)	0.08	0.08	0.08

混匀, 静置 15 分钟, 波长 550nm, 酶标仪测定各孔吸光度 OD 值



四、计算公式：

血清计算公式：

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{样品OD值}-\text{空白OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{稀释倍数}}{(4\text{倍})}$$

组织计算公式：

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\text{样品OD值}-\text{空白OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{稀释倍数}}{(2\text{倍})} \div \frac{\text{待测样品蛋白浓度}}{(gprpt/L)}$$

注：稀释倍数即样本测定前处理过程中对样本的稀释倍数。

五、技术参数：

项目序号	指标名称	指标要求
1	试剂盒检出限	0.2 μmol/L
2	试剂盒批内 CV	2.11%
3	试剂盒批间 CV	5.65%
4	试剂盒回收率	99.5%
5	线性范围 0.2-50 μmol/L	R ² =0.999
6	波长选择范围	530nm~570nm

六、操作注意点：

- 1、严格按照操作规程。
- 2、离心后的上层液一定要澄清，若有混浊要再次离心。
- 3、溶血及混浊血清对测定结果有影响。
- 4、血清及组织块-20℃冷冻后可保存1~2月。温度越低保存时间越长。零上4~5℃保存三天
- 5、培养液的测定参照血清（浆）的操作及计算。



试剂盒标准曲线的制备

1、前处理：

用双蒸水将 2mmol/L 亚硝酸钠标准液进行：1: 39、1:79、1: 99、1:159、1:319、1:639 稀释。

即亚硝酸钠标准液浓度依次为：

0.05mmol/L、0.025mmol/L、0.0125mmol/L、0.00625mmol/L、0.003125mmol/L

2，操作表：

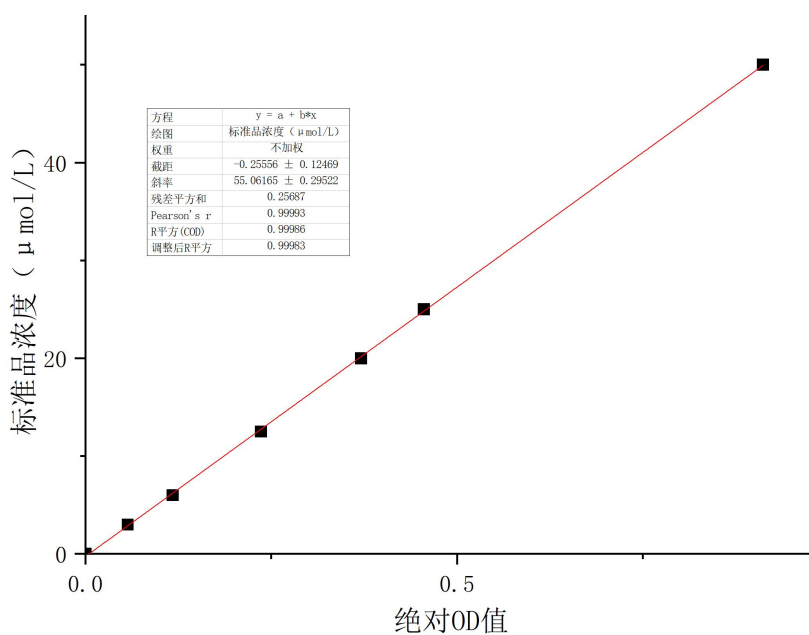
	空白孔	标准孔
双蒸水 (ml)	0.16	
不同浓度亚硝酸钠标准液 (ml)		0.16
显色剂 (ml)	0.08	0.08
混匀，静置 15 分钟，550nm 比色，酶标仪比色，测各孔 OD 值		

3，测定结果：

标准品浓度 (umol/L)	测定孔 OD 值	绝对 OD 值
0	0.0406	0
3.125	0.0975	0.0569
6.25	0.1581	0.1175
12.5	0.2766	0.236
20	0.4117	0.3711
25	0.4957	0.4551
50	0.9523	0.9117



4, 绘制图表



标准曲线采用 OriginPro 2021 软件绘制

NO 标准曲线

Line(a,b) Robust None

$R^2=0.99987183$ $DF \text{ Adj } ^2=0.99980775$

$FitStdErr=0.21352923$ $Fstat=39005.712$

$a = -0.16106951$

$b = 54.928309$



样例 1：血清（浆）中 NO 测定

一，样本前处理

血清（血浆）直接取原液进行测定。

二，操作过程

1、测定前处理：取血清（浆）原液 100 μ l 加试剂一 200 μ l，混匀，加试剂二 100 μ l，漩涡充分混匀后静置 10 分钟，3500~4000 转/分，离心 15 分钟，取上清液 160 μ l 操作。

2，操作表：

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水（ml）	0.16		
20 μ mol/L 亚硝酸钠标准液（ml）		0.16	
上清液（ml）			0.16
显色剂（ml）	0.08	0.08	0.08
混匀，静置 15 分钟，550nm 比色，酶标仪比色，测各孔 OD 值			

三，计算公式：

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{样品OD值}-\text{空白OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} (20\mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数} (4\text{倍})$$

注：稀释倍数=样本测定前处理过程中对样本的稀释

四，计算举例：

取血清 0.1ml,按照测定前处理开始进行操作，所得空白孔吸光度为 0.0406,标准孔吸光度为 0.4117,测定孔吸光度 0.0795,计算如下：

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) &= \frac{\text{样品OD值}-\text{空白OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} (20\mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数} (4\text{倍}) \\ &= \frac{0.0795-0.0406}{0.4117-0.0406} \times 20 \times 4 = 8.38\mu\text{mol/L} \end{aligned}$$



样例 2：组织中 NO 测定

一，样本前处理：

动物组织：准确称取组织的重量，按重量 (g) :体积 (ml) =1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测。

植物组织：准确称取待测植物组织的重量，按重量 (g) :体积 (ml) =1:4 的比例加入 4 倍体积的匀浆介质（均将介质推荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液），剪碎，冰水浴条件下机械匀浆，3500 转/分钟，离心 10 分钟，取上清液待测。

培养细胞样本的前处理：将制备好的细胞悬液取出，1000 转/分，离心 10 分钟，弃上清液，留细胞沉淀；用等渗缓冲液（推荐 0.1mol/L pH7-7.4 磷酸盐缓冲液）清洗 1~2 次，同样 1000 转/分，离心 10 分钟，弃上清液，留细胞沉淀；加入 0.2~0.3ml 的匀浆介质（推荐 0.1mol/L pH7-7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水）进行匀浆，冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆，制备好的匀浆液不离心待测。

二，操作过程：

1、测定前处理：取 10%匀浆上清 300 μ l 加试剂一 200 μ l，混匀，加试剂二 100 μ l，漩涡充分混匀后静置 10 分钟，3500~4000 转/分，离心 15 分钟，取上清液 160 μ l 操作。

2、操作表：

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水 (ml)	0.16		
20 μ mol/L 亚硝酸钠标准液 (ml)		0.16	
上清液 (ml)			0.16
显色剂 (ml)	0.08	0.08	0.08
混匀，静置 15 分钟，550nm 比色，酶标仪比色，测各孔 OD 值			

三，计算公式：



$$\text{NO含量} \quad (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\text{样品OD值}-\text{空白OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{稀释倍数}}{(2\text{倍})} \div \frac{\text{待测样品蛋白浓度}}{(gprpt/L)}$$

注：稀释倍数=样本测定前处理过程中对样本的稀释

四，计算举例：

取 10%小鼠肝匀浆上清 0.3ml, 按照测定前处理开始进行操作, 所得空白孔吸光度为 0.0406, 标准孔吸光度为 0.4117, 测定孔吸光度 0.0543, 同时测得 10%小鼠肝匀浆上清中总蛋白浓度为 11.6574 gprot/L, 计算如下：

$$\begin{aligned} \text{NO含量} \quad (\mu\text{mol/gprot}) &= \frac{\text{样品OD值}-\text{空白OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(20\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{稀释倍数}}{(2\text{倍})} \div \frac{\text{待测样品蛋白浓度}}{(gprpt/L)} \\ &= \frac{0.0543-0.0406}{0.4117-0.0406} \times 20 \times 2 \div 11.6574 = 0.127 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

