

# 组织及血液一氧化氮（NO）含量检测试剂盒说明书（化学法）

| 产品货号      | 产品名称             | 包装规格 | 测定方法 |
|-----------|------------------|------|------|
| AYHA5-M96 | 组织及血液一氧化氮（NO）试剂盒 | 96T  | 微量法  |

## 产品说明：

一氧化氮（Nitric Oxide, NO）是一种极不稳定的生物自由基，分子小，结构简单，常温下为气体，微溶于水，具有脂溶性，可快速透过生物膜扩散，作为一种新型的生物信使分子，在细胞间及细胞内发挥传递信号的作用。其广泛分布于生物体内各组织中，特别是神经组织中。在机体神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统中也起着十分重要的作用。

NO在体内或水溶液中极易氧化生成NO<sub>2</sub><sup>-</sup>。在酸性条件下，NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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。

## 试剂组成：

| 试剂名称   | 规格            | 保存条件   |
|--------|---------------|--------|
| 提取液    | 液体 110 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一    | 粉剂×1瓶         | 2-8℃保存 |
| 显色液A 液 | 液体 6 mL×1 瓶   | 2-8℃保存 |
| 显色液B 液 | 液体 6 mL×1 瓶   | 2-8℃保存 |
| 标准品    | 液体 1mL×1 支    | 2-8℃保存 |

## 溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入6mL 蒸馏水，可50℃助溶，2-8℃可保存12周。冷却至常温使用；
- 2、显色液：临用前根据样本数量按照显色液A液：显色液B液=50μL：50μL（100μL，1T）的比例配制显色液，充分混匀，现配现用；
- 3、标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠。
- 4、0.05μmol/mL 标准溶液的配制：取50μL 10μmol/mL 亚硝酸钠，加入950μL 蒸馏水，配制浓度为0.5μmol/mL；再取100μL 0.5μmol/mL 亚硝酸钠和900μL 蒸馏水混匀配制成0.05μmol/mL 的标准溶液备用。

## 操作步骤：

### 一、样本处理

1. 组织样本：按质量（g）：提取液体积（mL）2 ~5：10 的比例加入提取液（建议称取0.2g 样本，加入 1.0mL 提取液），冰浴匀浆后，于4℃，10000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌/细胞样本：按细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液体积（mL）1000~2000：1 的比例加入提取液（建议 1000 万细菌/细胞加入 1.0mL 提取液），冰浴超声破碎细菌/细胞（功率200W，超声3s，间隔7s，总时间5min），然后于4℃，10000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
3. 血清（血浆）等液体样本：直接测定。若液体有浑浊则离心取上清测定。

## 二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 在1.5mL EP管按下表顺序加样：

| 试剂名称 (μL)                          | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|------------------------------------|-----|-----|-----|
| 蒸馏水                                | -   | -   | 100 |
| 标准品                                | -   | 100 | -   |
| 样本                                 | 100 | -   | -   |
| 试剂一                                | 50  | 50  | 50  |
| 充分混匀，常温静置5min，于4℃，10000g离心5min，取上清 |     |     |     |
| 上清液                                | 100 | 100 | 100 |
| 显色液                                | 100 | 100 | 100 |

混匀，常温静置10min，于550nm处测定各管吸光值，分别记为A测定、A标准和A空白，计算ΔA测定=A测定-A空白，ΔA标准=A标准-A空白。空白管和标准管只需测1-2次。

## 三、NO 含量计算

1. 按样本蛋白浓度计算  

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$
2. 按样本质量计算  

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$
3. 按细菌/细胞数量计算  

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times N \div V_{\text{样总}}) = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$
4. 按液体体积计算  

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \times (C_{\text{标}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = 0.05 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标：标准管浓度，0.05μmol/mL；V样：加入样本体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌/细胞总数，以10<sup>4</sup>计。

### 注意事项：

- 1、如果ΔA 测定小于0.005，可以增加样本量后再进行测定；如果ΔA 测定大于0.7，建议将样本上清用提取液适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

2、如果样本上清有颜色（在 550nm 下有吸收峰），则需要补测样本的对照管，即将显色液用相同体积的蒸馏水 代替。在 550 nm 下测定吸光值A，分别记为 A 标准、A 测定、A 空白、A 对照，计算 $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}$ 。