

M5 HiPer 总一氧化氮检测试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer 总一氧化氮检测试剂盒	200T	MF809-01

【储存条件】 本试剂盒包括 2 个部分，4℃组分和-20℃组分，请置于正确温度保存

【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（微板法）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。

【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 100mL×2 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 4 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 0.31mL 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	粉体 2 支	-20℃保存	临用前加 1ml 蒸馏水，若一次性用不完，可分装保存，避免反复冻融。
试剂三	液体 4 支	-20℃避光保存	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 2 瓶	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 2.1mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 6mL×2 瓶	4℃避光保存	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 6mL×2 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 2 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。

【所需的仪器和用品】

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、研钵或匀浆器、蒸馏水。

【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

A、组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4°C×8000 rpm, 离心 10min, 取上清液沸水 (95-100°C) 5min 后, 于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清, 上清置冰上待测。

【注意】: 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。

B、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°C×8000 rpm, 离心 10min, 取上清液沸水 (95-100°C) 5min 后, 于 12000 rpm 再离心 5min 后取上清, 上清置冰上待测。

【注意】: 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 比例进行提取。

C、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) 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 530nm。
- 2) 其余试剂于 37°C 预热 5min。在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (做一次)	空白管 (做一次)
试剂一	5	5	5
试剂二	10	10	10
试剂三	5	5	5
样本	60		
标准品		60	
蒸馏水			60
混匀, 37°C 反应 60min			
试剂四	20	20	20
混匀, 37°C 反应 30min			
反应 mix	100	100	100
混匀, 37°C 避光反应 15min, 于 530nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【注意】

- A、若 ΔA 在零附近徘徊, 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。
- B、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: 60μL 样本+40μL 蒸馏水+100μL 的反应 mix, 混匀, 37°C 避光反应 15min, 于 530nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。
- C、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, 测定管和标准管和空白管都取出 150μL 至 96 孔板中于 530nm 处读取吸光值 A。

【结果计算】

1、按样本质量计算：

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(\text{V1}\div\text{V}\times\text{W})\times\text{D} \\ =0.1\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{W}\times\text{D}$$

2、按细胞/细菌数量计算：

$$\text{NO 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(\text{V1}\div\text{V}\times 500)\times\text{D}\times 103 \\ =0.2\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

3、按液体体积计算：

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=(\text{C 标准}\times\text{V1})\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{V1}\times\text{D} \\ =0.1\times\Delta\text{A}\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

C 标准---0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中样品体积，0.06mL；

W---样品质量，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。