（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

**产品货号：E-BC-K135-M**

**产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)**

**检测仪器：酶标仪(520-550 nm)**

# Elabscience®一氧化氮(NO)比色法测试盒

# (硝酸还原酶法)

# Nitric Oxide (NO) Colorimetric Assay Kit

# (Nitrate Reductase Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、尿液、组织、细胞及细胞上清等样本中 NO 的含量。

## 检测原理

一氧化氮（NO）化学性质活泼，在体内很快代谢为 $NO^{2-}$和 $NO^{3-}$，而 $NO^{2-}$又进一步转化为 $NO^{3-}$，本法利用硝酸还原酶特异性将 $NO^{3-}$还原为 $NO^{2-}$，通过显色深浅来测定其浓度的高低。

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 1 (Size 1)(48 T) | 规格 2 (Size 2)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|---|---|---|---|---|
| 试剂一 (Reagent 1) | 酶试剂 (Enzyme Reagent) | 粉剂×2 支 | 粉剂×4 支 | -20°C 避光保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 底物 (Substrate) | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | -20°C 避光保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 硫酸盐溶液 (Sulfate Solution) | 1.5 mL×1 支 | 3 mL×1 瓶 | -20°C 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 碱试剂 (Alkaline Reagent) | 0.75 mL×1 支 | 1.5 mL×1 支 | -20°C 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 显色剂 A (Chromogenic Agent A) | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | -20°C 避光保存 6 个月 |
| 试剂六 (Reagent 6) | 显色剂 B (Chromogenic Agent B) | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | -20°C 避光保存 6 个月 |
| 试剂七 (Reagent 7) | 酸试剂 (Acid Reagent) | 1.5 mL×1 支 | 3 mL×1 瓶 | -20°C 保存 6 个月 |
| 试剂八 (Reagent 8) | 1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard) | 0.75 mL×1 支 | 1.5 mL×2 支 | -20°C 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 48 孔×1 块 | 96 孔×1 块 | 无要求 |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪(520-550 nm，最佳检测波长 530 nm)、37°C 恒温箱。

## 试剂准备

① 检测前，试剂一，试剂二放于冰盒待用，其余试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液的配制：

取一支试剂一中加入1.0 mL的超纯水，充分混匀，按需现用现配，2-8°C避光保存6 h。

③ 试剂二工作液的配制：

取一瓶试剂二加入5 mL的超纯水，充分混匀，可分装-20°C避光保存3天。

④ 酶工作液的配制：

按试剂一工作液：试剂二工作液=1：1的体积比混合均匀，按需现用现配，2-8°C避光可保存6 h。

⑤ 试剂五工作液的配制：

取一瓶试剂五加入6 mL超纯水，90°C水浴加热溶解待用，2-8°C避光可保存3天，再次使用时需90°C水浴加热溶解。

⑥ 试剂六工作液的配制：

取一瓶试剂六加入4 mL超纯水溶解混匀，2-8°C避光可保存3天。

⑦ 显色工作液的配制：

按试剂五工作液：试剂六工作液：试剂七=5：2：2的体积比混合均匀，按需配制，现用现配，避光保存。

⑧ 40 μmol/L标准品溶液的配制：

按试剂八：超纯水=1:24体积比进行配制，按需配制，现用现配，避光保存。

⑨ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **标准品浓度(μmol/L)** | **0** | **8** | **16** | **20** | **24** | **28** | **32** | **40** |
| **40 μmol/L 标准品(μL)** | 0 | 200 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 1000 |
| **超纯水(μL)** | 1000 | 800 | 600 | 500 | 400 | 300 | 200 | 0 |

## 样本准备

### ① 样本处理

血清(浆)、尿液等液体样本：可直接测定；

组织样本：匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆后，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：收集1×10^6的细胞，加入0.3 mL生理盐水(0.9%NaCl)进行匀浆，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围(1.38-40 μmol/L)，请参考下表稀释（仅供参考）：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|---|---|---|---|
| 人血清 | 不稀释 | 人尿液 | 20-30 |
| 小鼠血清 | 1-3 | 10%大鼠脑组织 | 不稀释 |
| 鸡血浆 | 不稀释 | 10%大鼠肾组织 | 不稀释 |
| 大鼠尿液 | 10-20 | 10%青菜叶组织 | 不稀释 |
| 1×10^6 个 Jurkat 细胞 | 不稀释 | | |

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

## 实验关键点

① 配制好的显色工作液需要避光保存。

② 酶工作液与样本或标准品加入 EP 管后，需将其混匀。

③ 吸取孵育反应后的离心上清时，避免将 EP 管底的沉淀吸出。

## 操作步骤

**孵育反应：**

① 标准管：取 A 体积不同浓度标准品加入至相应 1.5 mLEP 管中。
测定管：取 A 体积待测样本加入至相应 1.5 mLEP 管中。
注：(A 为样本的加样量=标准品的加样量，参考加样量：组织或细胞匀浆 100-200 μL；血清血浆 80-100 μL)

② 向步骤①各管中加入 60 μL 的酶工作液。

③ 混匀，37°C 避光孵育 60 min。

④ 孵育完成后，向步骤③上述各管中加入 20 μL 的试剂三。

⑤ 向步骤④各管中加入 10 μL 的试剂四。

⑥ 混匀，室温静置 5 min，10000 × g 离心 10 min，取上清待测。

**显色反应：**

① 标准孔：向酶标板各标准孔加入 50 μL 显色工作液；
测定孔：向酶标板各测定孔中加入 50 μL 显色工作液。

② 标准孔：向步骤①标准孔中加入孵育反应后 120 μL 标准管上清；
测定孔：向步骤①测定孔中加入孵育反应后 120 μL 测定管上清。

③ 振板 5 s，室温静置 5 min，酶标仪于 530 nm 处测定各孔 OD 值。

## 操作表

**孵育反应：**

| | 标准管 | 测定管 |
|---|---|---|
| 不同浓度标准品(μL) | A | - |
| 待测样本(μL) | - | A |
| 酶工作液(μL) | 60 | 60 |
| 混匀，37°C 避光孵育 60 min | | |
| 试剂三(μL) | 20 | 20 |
| 试剂四(μL) | 10 | 10 |
| 混匀，室温静置 5 min，10000 × g 离心 10 min，取上清待测。 | | |

**注：(A 为样本的加样量=标准品的加样量，参考加样量：组织或细胞匀浆 100-200 μL；血清血浆 80-100 μL)**

**显色反应：**

| | 标准孔 | 测定孔 |
|---|---|---|
| 显色工作液(μL) | 50 | 50 |
| 标准管上清(μL) | 120 | - |
| 测定管上清(μL) | - | 120 |
| 振板 5s，室温静置 5 min，酶标仪于 530 nm 处测定各孔 OD 值。 | | |

**本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。**

## 结果计算

**标准品拟合曲线：** $y = ax + b$

**血清(浆)、细胞上清等液体样本中 NO 含量计算公式：**

$$\text{NO 含量 (μmol/L)} = (\Delta A_{530} - b) \div a \times f$$

**组织与细胞样本中 NO 含量的计算：**

$$\text{NO 含量 (μmol/gprot)} = (\Delta A_{530} - b) \div a \div C_{pr} \times f$$

**注解：**

x：标准品浓度

y：标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

$\Delta A_{530}$：测定孔 OD 值-空白孔 OD 值

f：加入检测体系前样本的稀释倍数

$C_{pr}$：加入检测体系前样本的蛋白浓度(gprot/L)

# 附录1 关键数据

## 1. 技术参数

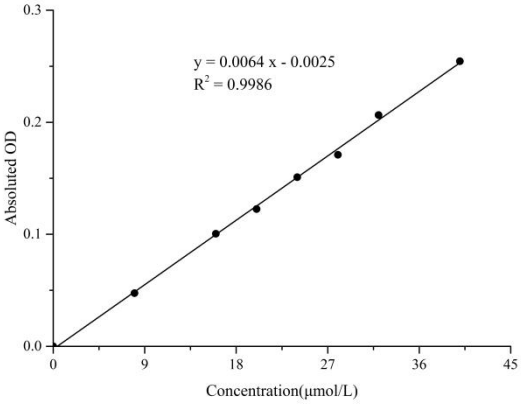
| | | | |
|---|---|---|---|
| **检测范围** | 1.38-40 μmol/L | **批间差** | 8 % |
| **灵敏度** | 1.38 μmol/L | **批内差** | 6 % |
| **回收率** | 95 % | | |

## 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量100 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

| **标准品浓度 (μmol/L)** | **0** | **8** | **16** | **20** | **24** | **28** | **32** | **40** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OD 值** | 0.043 | 0.092 | 0.144 | 0.166 | 0.194 | 0.214 | 0.249 | 0.295 |
| | 0.043 | 0.089 | 0.143 | 0.165 | 0.194 | 0.214 | 0.250 | 0.300 |
| **平均 OD 值** | 0.043 | 0.091 | 0.144 | 0.166 | 0.194 | 0.214 | 0.250 | 0.298 |
| **绝对 OD 值** | 0 | 0.048 | 0.101 | 0.123 | 0.151 | 0.171 | 0.207 | 0.255 |

②绘制标曲(如下图)：



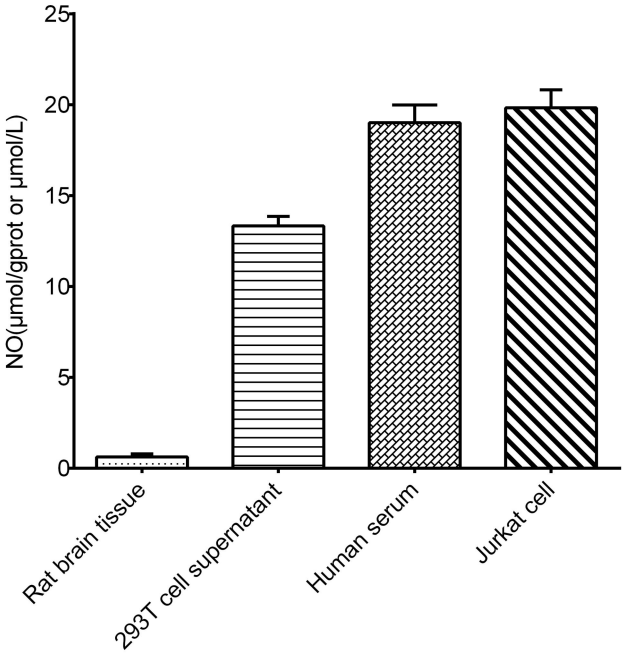
# 附录 2 实例分析

**例如检测大鼠脑组织(数据仅供参考)：**

取10%大鼠脑组织匀浆上清液100 μL，按说明书操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.0064x + 0.0025，测定孔OD值为0.089，空白孔OD值为0.060，10%大鼠脑组织匀浆蛋白浓度为4.74 gprot/L，计算结果为：

$$\text{NO 含量 (μmol/gprot)} = (0.089 - 0.060 - 0.0025) \div 0.0064 \div 4.74 = 0.87\ \text{μmol/gprot}$$

按照说明书操作，测定大鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度为4.74 gprot/L，加样量100 μL)、293T细胞上清(加样量100 μL)、人血清(加样量100 μL)和Jurkat细胞(蛋白浓度为1.2 gprot/L，加样量100 μL)中NO的含量(如下图)：



**声明**

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

# 附录3 客户发表文献


1. Ji Z, Ma W, Liang P, et al. Anti-inflammatory potential of mycoprotein peptides obtained from fermentation of Schizophyllum commune DS1 with young apples[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281(Part4):13. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.136638.
2. Syed R U, Hadi M A, Almarir A M, et al. Rhodiola rosea L. extract ameliorates ethanol-induced gastric ulcer in rats by alleviating oxidative stress and inflammation via NF-κB pathway inhibition[J]. Current Plant Biology, 2024, 40(000). DOI:10.1016/j.cpb.2024.100421.
3. Adewoyin M, Hamarsha A, Akinsola R, et al. Intraperitoneal Injection of the Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicle (OMV) Stimulated Expressions of Neuroinflammatory Markers and Histopathological Changes in the Brains of Adult Zebrafish[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(20). DOI:10.3390/ijms252011025.
4. Du H, Zhang S, Yuan K ,et al.Integrated Metabolomics and Network Pharmacology Study on the Mechanism of Rehmanniae radix Extract for Treating Thrombosis[J]. Drug Design, Development & Therapy, 2024,18. DOI:10.2147/DDDT.S475838.
5. Wang C, Xiong Z M, Cong Y Q, et al. Revealing the pharmacological mechanisms of nao-an dropping pill in preventing and treating ischemic stroke via the PI3K/Akt/eNOS and Nrf2/HO-1 pathways[J]. Scientific reports, 14(1):11240[2025-04-22]. DOI:10.1038/s41598-024-61770-4.