

(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℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	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 ℃ 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 ℃ 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 ℃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 ℃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 ℃水浴加热溶解待用，2-8 ℃避光可保存3天，再次使用时需90 ℃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 ℃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($\mu\text{mol/L}$)	0	8	16	20	24	28	32	40
40 $\mu\text{mol/L}$ 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， $10000 \times g$ 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， $10000 \times g$ 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 $\mu\text{mol/L}$)，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 mL EP 管中。
测定管：取 A 体积待测样本加入至相应 1.5 mL EP 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times g$ 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 \times 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:

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

($\mu\text{mol/L}$)

组织与细胞样本中 NO 含量的计算:

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

($\mu\text{mol/gprot}$)

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

ΔA_{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

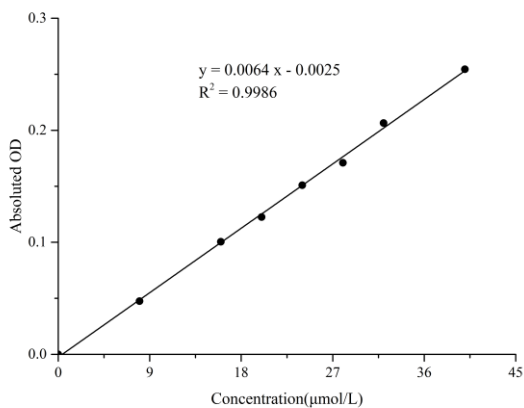
检测范围	1.38-40 $\mu\text{mol/L}$	批间差	8 %
灵敏度	1.38 $\mu\text{mol/L}$	批内差	6 %
回收率	95 %		

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 ($\mu\text{mol/L}$)	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):



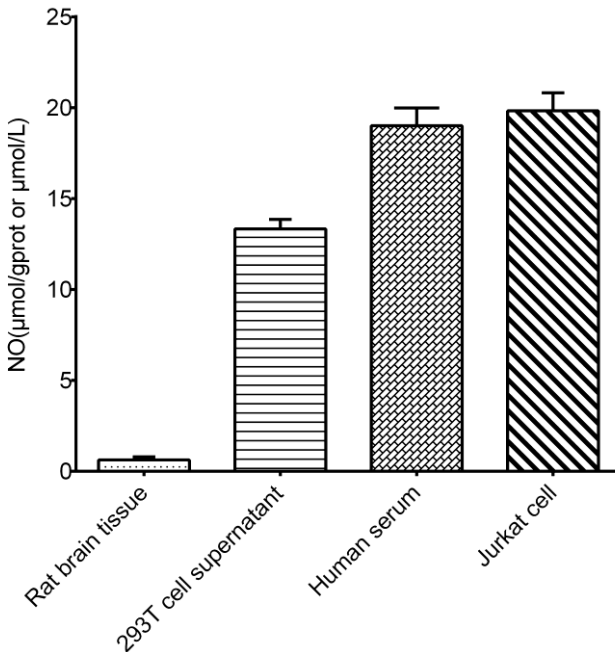
附录 2 实例分析

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:

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

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。

