（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-K035-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(540-550 nm)

Elabscience®一氧化氮（NO）比色法测试盒

Nitric Oxide (NO) Colorimetric Assay Kit

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。

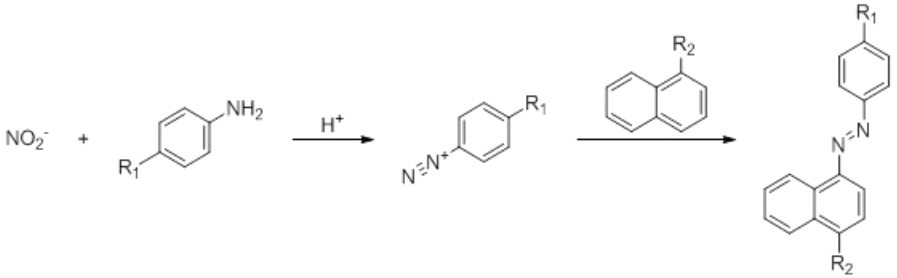
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、及动植物组织样本中的 NO 含量。

检测原理

NO 在体内或水溶液中极易氧化生成 NO_2^-，与显色剂生成淡红色偶氮化合物（如下图），生成偶氮化合物的浓度与 NO 的浓度具有线性关系，通过比色可以间接计算 NO 的浓度。试剂一和试剂二的作用，为除去样本有色物质的干扰。



本试剂盒检测组织样本时，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)	硫酸盐溶液 (Sulphate Solution)	12 mL × 1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	碱溶液 (Alkali Reagent)	12 mL × 1 瓶	12 mL × 1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	1.9 mL×1 支	1.9 mL×2 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酸溶液 (Acid Solution)	1.3 mL×1 支	1.3 mL×2 支	2-8°C 保存 6 个月

试剂六 (Reagent 6)	亚硝酸钠标准品 (Sodium Nitrite Standard)	粉剂×1 支	粉剂×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（540-550 nm）、涡旋混匀仪、微量移液器（1000 μL，200 μL，100 μL，10 μL）、离心机。

耗材：枪头（1000 μL，200 μL，10 μL ）、EP 管（5 mL，2 mL）。

试剂：双蒸水或去离子水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

试剂准备

① 试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液的配制：

将试剂四用3.8 mL双蒸水溶解，2-8℃避光可保存2个月。

③ 显色剂工作液的配制：

按试剂三：试剂四工作液：试剂五=3: 3: 2比例混匀，现用现配。

④ 2 mmol/L标准品的配制：

取一支试剂六用2 mL双蒸水溶解，现配现用。

⑤ 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**	**10**	**20**	**30**	**40**	**60**	**80**	**100**
2 mmol/L $NaNO_2$(μL)	0	10	20	30	40	60	80	100
双蒸水(μL)	2000	1990	1980	1970	1960	1940	1920	1900

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为 PBS（0.01 M，pH 7.4）。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。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：0.16-100 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	大鼠血清	不稀释
人血浆	不稀释	大鼠血浆	不稀释
10%小鼠肝匀浆	不稀释	10%绿萝匀浆	不稀释

注：稀释液为双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

① 试剂一和试剂二处理后的上清液必须澄清。

② 测定 OD 值时，酶标板孔中不能有气泡。

操作步骤

① 标准管：取 8 个不同浓度的标准品各 a μL，分别加入 8 个 1.5mL 的 EP 管中；

样本管：取 a μL 待测样本，加入 1.5 mL EP 管中。（a 为样本的加样量=标准品的加样量；血清参考加样量：200-300 μL，组织参考加样量 100-300 μL。）。

② 向步骤①中的各管加入 200 μL 试剂一，涡旋混匀。

③ 向步骤②中的各管加入 100 μL 试剂二，涡旋混匀。

④ 室温静置 15 min，3100 × g 离心 10 min。（若上清液中含有部分沉淀物，将上清液转入新的 EP 管中，再次离心）。

⑤ 分别取 160 μL 上清液，加入到对应的酶标板孔。

⑥ 向各孔中加入 80 μL 显色剂工作液。

⑦ 酶标仪振荡混匀 2 min，室温静置 15 min，酶标仪 550 nm 测定 OD 值。

注：试剂加入酶标孔时，应触酶标板底加入；加样要慢，避免产生气泡。（气泡影响测定结果）

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度亚硝酸钠（μL）	a	
待测样本（μL）		a
试剂一（μL）	200	200
试剂二（μL）	100	100
混匀后，室温静置 15 min，3100×g，10 min 离心，取上清液。		
上清液（μL）	160	160
显色剂工作液（μL）	80	80
酶标仪振荡混匀 2 min，室温静置 15 min，酶标仪 550 nm 测定 OD 值。		

本试剂盒检测组织样本时，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)NO 浓度计算公式：

$$NO\ 含量（\mu mol/L）= (\Delta A_{550} - b) \div a \times f$$

组织 NO 浓度计算公式：

$$NO\ 含量（\mu mol/gprot）= (\Delta A_{550} - b) \div a \times f \div C_{pr}$$

注解：

y：标准品在 550 nm 波长处的绝对 OD 值（标准品测定 OD 值-空白 OD 值）

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

C_{pr}：样本的蛋白浓度（gprot/L）

ΔA_{550}：绝对 OD 值（样本测定 OD 值-空白 OD 值）

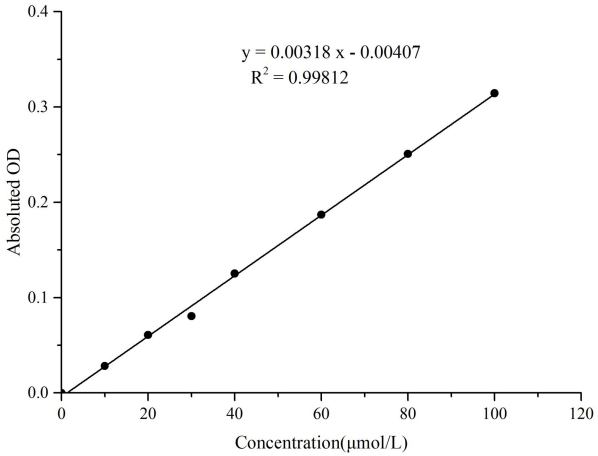
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.16-100 μmol/L	**平均批间差**	3.7 %
灵敏度	0.16 μmol/L	**平均批内差**	2.4 %
平均回收率	102 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准曲线(如下图):



附录2 实例分析

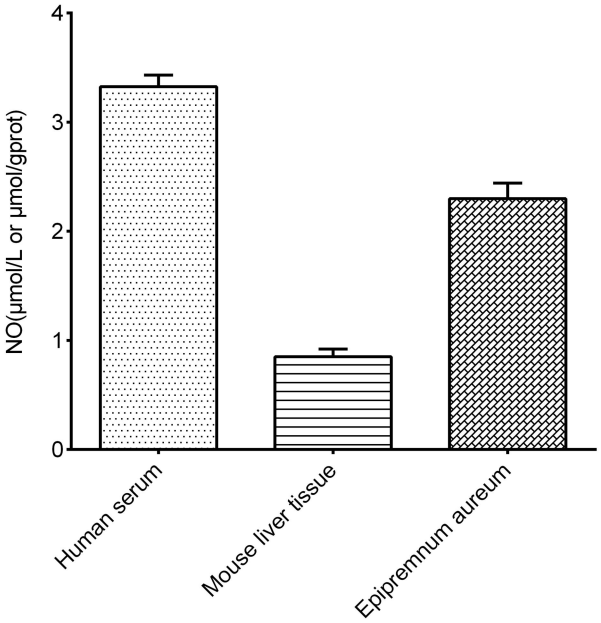
例如检测人血清(数据仅供参考)：

人血清不稀释，按照操作步骤进行实验，结果如下：

标准品拟合曲线：y = 0.00215 x + 0.00514，空白孔OD值为0.035，测定孔OD值为0.056，计算结果为：

$$\text{NO 含量（μmol/L）} = (0.056-0.035-0.00514) \div 0.00215 = 3.20\ \mu\text{mol/L}$$

按照说明书操作，测定人血清（加样量100 μL）和小鼠肝脏组织（10%组织匀浆的蛋白含量1.82 g/L，加样量300 μL）、绿萝叶子（5%组织匀浆的蛋白含量0.99 g/L，加样量300 μL）中NO含量（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	微量移液器使用不熟练	小心加样，避免溅到其它板孔中
	板孔中存在气泡	用枪头轻轻戳破气泡
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果>100 μmol/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

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4 客户发表文献

1. Xia Y, Zeng Y, Jiang R. Effect of chronic periodontitis on the endothelial glycocalyx of rat penile corpus cavernosum[J]. Andrology, 2024.

2. Li J, Hu H, Xu X, et al. Mechanisms of action of ethyl acetate fractions of Liparis nervosa (Thunb.) Lindl. as potential central anti-nociceptive agents[J]. Inflammopharmacology, 2024: 1-17.

3. Chen J, Wu L, Xie X, et al. Carthamus tinctorius L. protects cerebral ischemia/reperfusion injury via arachidonic acid/p53-mediated apoptosis axis[J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1504109.