

(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。

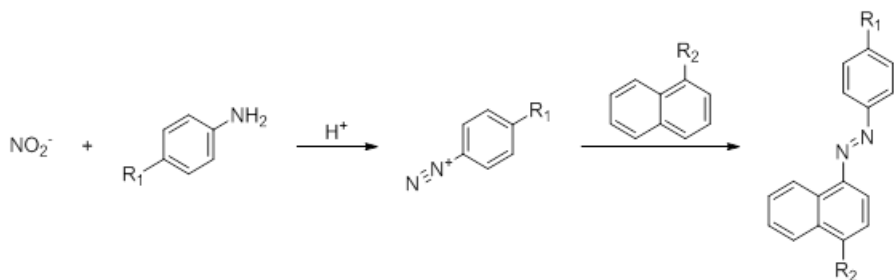
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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℃ 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（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°C, 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 \times 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 \times 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：

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

组织 NO 浓度计算公式：

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

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)

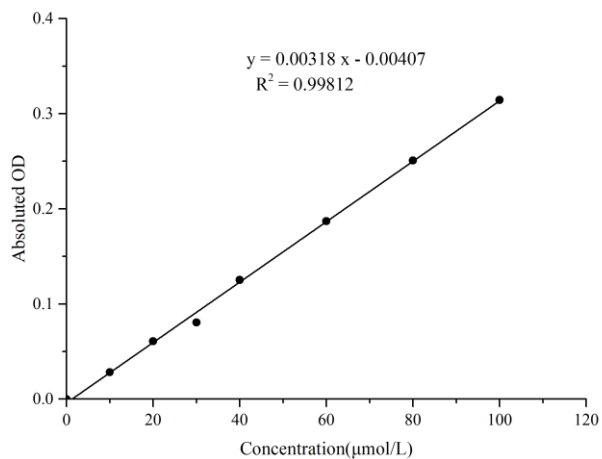
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.16-100 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	3.7 %
灵敏度	0.16 $\mu\text{mol/L}$	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

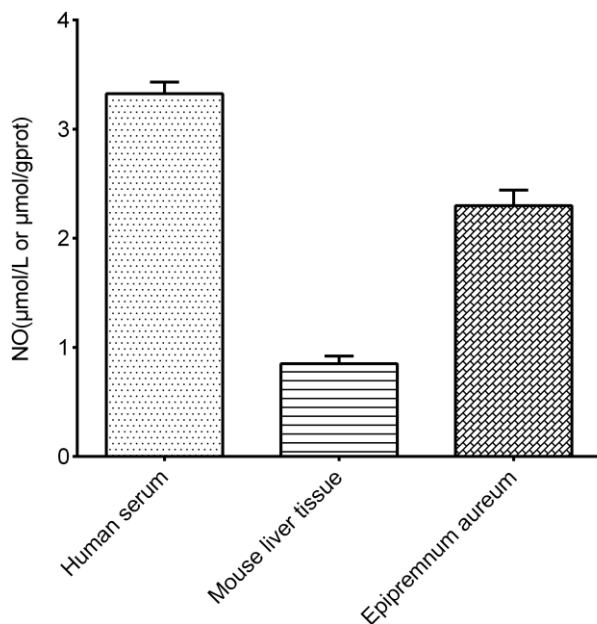
例如检测人血清(数据仅供参考):

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: $y = 0.00215x + 0.00514$, 空白孔OD值为0.035, 测定孔OD值为0.056, 计算结果为:

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

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 $\mu\text{mol/L}$	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. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose

- and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113
22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
 23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
 24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
 25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
 26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
 27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
 28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
 29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
 30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508