

(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-S

产品规格: 50 assays(48 samples)/100 assays(96 samples)

检测仪器: 紫外-可见光分光光度计 (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。

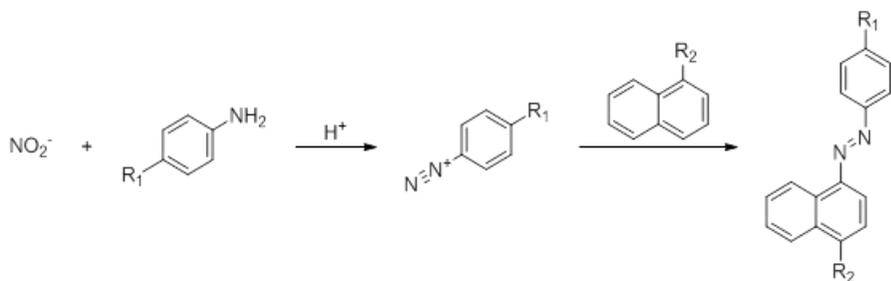
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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) (50 assays)	规格 2(Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	硫酸盐溶液 (Sulphate Solution)	50 mL×2 瓶	50 mL×4 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	碱溶液 (Alkali Reagent)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	19 mL×1 瓶	38 mL×1 瓶	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 支	粉剂×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酸溶液 (Acid Solution)	12.5 mL×1 瓶	25 mL×1 瓶	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
--------------------	---	--------	--------	------------------

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：紫外-可见分光光度计（550nm）、涡旋混匀仪、磁力搅拌器、分析天平、微量移液器（1000 μ L，200 μ L，100 μ L，10 μ L）、离心机、烧杯（50 mL，25 mL）。

耗材：枪头（1000 μ L，200 μ L，10 μ L）、EP 管（5 mL，2 mL）、吸水纸、擦镜纸、磁力搅拌子。

试剂：双蒸水、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：

将试剂四加入37.5 mL双蒸水溶解，混匀即可，2-8°C避光保存2个月。如果您一次用不完，可以取部分粉剂按1.5 mg/mL的浓度配制。

③ 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。

④ 40 μ mol/L亚硝酸钠标准品配制：

将2 mmol/L标准品：双蒸水按1：49的比例稀释，混匀，现用现配。

⑤ 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。

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: 0.97-700 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

试剂一和试剂二处理后的上清液必须澄清。

操作步骤

- ① 空白管：取 A mL 双蒸水，加入 5 mL EP 管中；
标准管：取 A mL 40 $\mu\text{mol/L}$ 亚硝酸钠标准品，加入 5 mL EP 管中；
测定管：取 A mL 待测样本，加入 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：0.2-0.3 mL，组织参考加样量 0.1-0.2 mL。）
- ② 向步骤①中的各管加入 1.6 mL 试剂一，涡旋混匀。
- ③ 向步骤②中的各管加入 0.8 mL 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 1.6 mL 上清液，加入相应的 5 mL EP 管中。
- ⑥ 向步骤⑤中的各管加入 0.8 mL 显色剂工作液，混匀，室温静置 20 min。
- ⑦ 550 nm，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测其吸光度。

操作表

	空白管	标准孔	测定孔
双蒸水 (mL)	A		
40 $\mu\text{mol/L}$ 亚硝酸钠 (mL)		A	
待测样本 (mL)			A
试剂一 (mL)	1.6	1.6	1.6
试剂二 (mL)	0.8	0.8	0.8
混匀，室温静置 15 min，3100 \times g 离心 10 min，取上清液。			
上清液 (mL)	1.6	1.6	1.6
显色剂 (mL)	0.8	0.8	0.8
混匀，室温静置 20 min，550 nm，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测其吸光度。			

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

血清（浆）NO 浓度计算公式：

$$\begin{aligned} \text{NO 浓度} &= \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \\ (\mu\text{mol/L}) & \end{aligned}$$

组织 NO 浓度计算公式：

$$\begin{aligned} \text{NO 浓度} &= \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div C_{\text{pr}} \\ (\mu\text{mol/gprot}) & \end{aligned}$$

注解：

ΔA_1 ：样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2 ：标准 OD 值-空白 OD 值

c：亚硝酸钠浓度（40 $\mu\text{mol/L}$ ）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} ：样本的蛋白浓度（g/L）

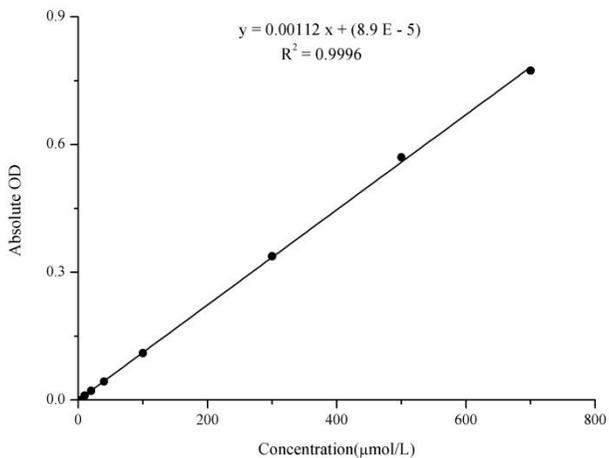
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.97-700 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	5.2 %
灵敏度	0.97 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	3.4 %
平均回收率	99 %		

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

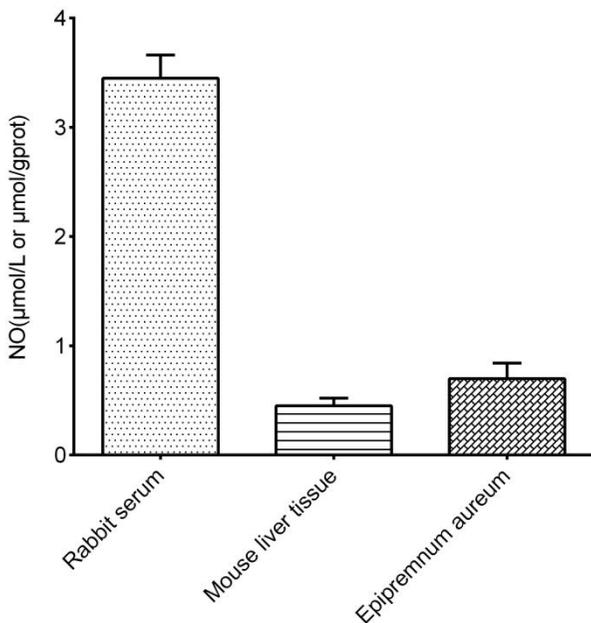
例如检测小鼠肝脏组织(数据仅供参考):

取0.3 mL 10%小鼠肝匀浆按操作表操作, 结果如下:

空白管平均OD值为0.004, 标准管平均OD值为0.065, 测定管平均OD值为0.010, 同时测得10%匀浆蛋白浓度8.65 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{NO 含量} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{0.010-0.004}{0.065-0.004} \times 40 \div 8.65 = 0.45 \mu\text{mol/gprot}$$

按照说明书操作, 测定兔血清(加样量0.1 mL)、小鼠肝脏组织(10%组织匀浆的蛋白含量8.65 g/L, 加样量0.3 mL)、绿萝叶子(10%组织匀浆的蛋白含量1.62 g/L加样量0.4 mL)中的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
	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
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>700 $\mu\text{mol/L}$	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. Turhan D O, Güngördü A. Developmental, toxicological effects and recovery patterns in *Xenopus laevis* after exposure to penconazole-based fungicide during the metamorphosis process[J]. *Chemosphere*, 2022, 303: 135302.
2. Wang B, Liu J, Lei R, et al. Cold exposure, gut microbiota, and hypertension: A mechanistic study[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 833: 155199.
3. 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 and Medicine*, 2022, 179: 229-241.
4. Pham D T, Thao N T P, Thuy B T P, et al. Silk fibroin hydrogel containing *Sesbania sesban* L. extract for rheumatoid arthritis treatment[J]. *Drug delivery*, 2022, 29(1): 882-888.
5. 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- κ B pathway inhibition[J]. *Current Plant Biology*, 2024, 40: 100421.
6. Popa A, Usatiuc L O, Scurtu I C, et al. Assessing the Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Mangiferin in Murine Model for Myocarditis: Perspectives and Challenges[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(18): 9970.

