（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-K070-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®亚硝酸盐比色法测试盒

Nitrite 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。

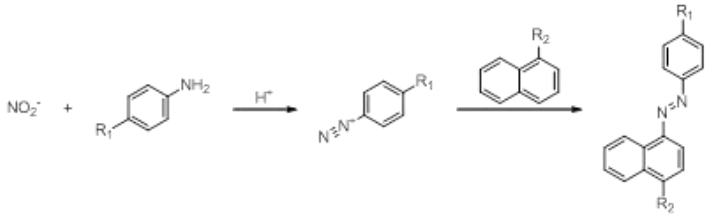
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动植物组织样本中 NO^{2-}的含量。

检测原理

NO^{2-}与显色剂生成淡红色偶氮化合物（如图），生成偶氮化合物的浓度与NO^{2-}的浓度具有线性关系，通过比色可以知道 NO^{2-}的浓度。试剂一和试剂二的作用，除去样本有色物质的干扰。



本试剂盒测组织样本时，需要用到测总蛋白浓度试剂盒，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

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)	盐溶液 (Saline Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	碱溶液 (Alkali Reagent)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃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℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酸溶液 (Acid Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 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×1 支	-20℃ 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-可见光分光光度计（550 nm）、涡旋混匀仪、磁力搅拌器、离心机、烧杯（50 mL，25 mL）。

耗材：枪头（1000 μL，200 μL，10 μL）、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 试剂三工作液的配制：

将试剂三粉剂加入60-70℃的双蒸水30 mL，搅拌充分溶解，2-8℃避光保存3个月。

③ 试剂四工作液的配制：

将试剂四粉剂加入12 mL双蒸水，搅拌充分溶解，2-8℃避光保存2个月。若试剂出现颜色加深发黑，舍弃。

④ 显色剂的配制：

按试剂三工作液：试剂四工作液：试剂五为2.5: 1: 1的体积比混匀，现用现配，2-8℃避光保存2天。

⑤ 2 mmol/L标准品的配制：

取1支试剂六用2 mL双蒸水溶解，现配现用。

⑥ 100 μmol/L标准品的配制：

将2 mmol/L标准品：双蒸水为1: 19的体积比混匀，现用现配。

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：常规匀浆处理(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：1.36-500 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

NO_2^- **浓度（μmol/L）**	**样本与稀释液的体积比**	**稀释倍数**
<500	不稀释	1
500-5000	1:9	10

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

实验关键点

加入试剂一、二混匀离心后的上清液必须澄清，若有浑浊要再次离心。。

操作步骤

① 空白管：取 A mL 双蒸水，加入 2 mL EP 管中；
标准管：取 A mL 100 μmol/L 亚硝酸钠标准品，加入 2 mL EP 管中；
测定管：取 A mL 待测样本，加入 2 mL EP 管中。（A 为样本的加样量=标准品的加样量=双蒸水的加样量；血清（浆）参考取样量：0.2-0.4 mL，组织匀浆参考取样量 0.1-0.2 mL）

② 向步骤①中的各管加入试剂一 0.8 mL，涡旋混匀。

③ 向步骤②中的各管加入试剂二 0.4 mL，涡旋混匀。

④ 室温静置 10 min，2000 × 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 0.8 mL 上清液，加入相应的 2 mL EP 管中。

⑥ 向步骤⑤中的各管加入 0.4 mL 显色剂，混匀，室温静置 15 min。

⑦ 波长 550 nm，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定 OD 值。

操作表

	空白管	**标准管**	**测定管**
双蒸水（mL）	A	--	--
100 μmol/L 亚硝酸钠（mL）	--	A	--
待测样本（mL）	--	--	A
试剂一（mL）	0.8	0.8	0.8
试剂二（mL）	0.4	0.4	0.4
混匀，室温静置 10 min，2000 × g 离心 10 min，取上清液。			
上清液（mL）	0.8	0.8	0.8
显色剂（mL）	0.4	0.4	0.4
混匀，室温静置 15 min，波长 550 nm，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定 OD 值。			

结果计算

血清（浆）亚硝酸盐浓度计算公式：

$$\begin{matrix} NO_2^- \text{含量} \\ (\mu mol/L) \end{matrix} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f$$

组织亚硝酸盐浓度计算公式：

$$\begin{matrix} NO_2^- \text{含量} \\ (\mu mol/gprot) \end{matrix} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div C_{pr}$$

注解：

ΔA_1：样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2：标准 OD 值-空白 OD 值

c：标准品浓度（100 μmol/L）

f：样本加入检测体系前稀释的倍数

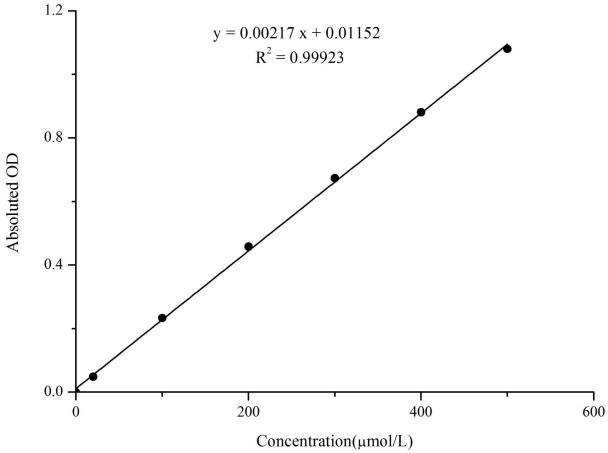
C_{pr}：待测样本的蛋白浓度（gprot/L）

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	1.36-500 μmol/L	**平均批间差**	3.3 %
灵敏度	1.36 μmol/L	**平均批内差**	2.6 %
平均回收率	97 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

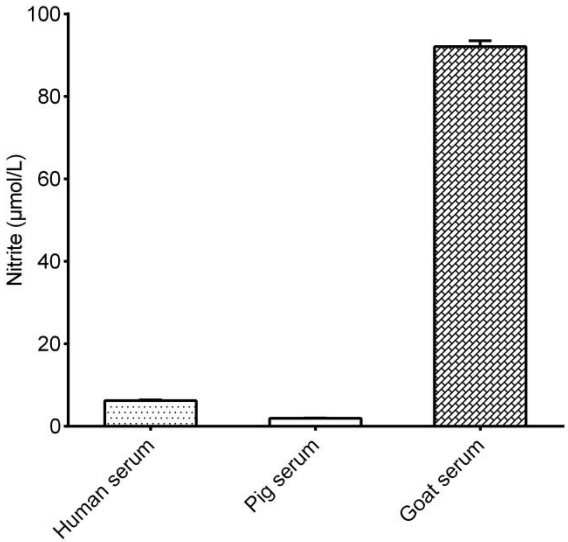
例如检测人血清(数据仅供参考)：

取0.3 mL人血清样本，按操作表操作，结果如下。

空白管平均OD值为0.003，标准管平均OD值为0.476，测定管平均OD值为0.033，计算结果为：

$$\begin{matrix}NO_2^-\text{含量}\\(\mu mol/L)\end{matrix}=\frac{(0.033-0.003)}{(0.476-0.003)}\times 100=6.24\ \mu mol/L$$

按照说明书操作，测定人血清（加样量0.3 mL）、猪血清（加样量0.2 mL）、山羊血清（加样量0.2 mL）中NO_2^-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	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>500 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. Mosalam E M , Elberri A I , Abdallah M S ,et al.Mechanistic Insights of Neuroprotective Efficacy of Verapamil-Loaded Carbon Quantum Dots against LPS-Induced Neurotoxicity in Rats[J].International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(14).DOI:10.3390/ijms25147790.

2. Satyam S M , Bairy L K , Rehman A ,et al.Unlocking Synergistic Hepatoprotection: Dapagliflozin and Silymarin Combination Therapy Modulates Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 Pathway in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats[J].Biology (2079-7737), 2024, 13(7).DOI:10.3390/biology13070473.