

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ274

产品规格：96T(39 samples)

检测仪器：酶标仪(530-550 nm)

Elabscience®硝酸盐比色法测试盒

Nitrate 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(浆)、尿液、组织、细胞及细胞上清中的硝酸盐(NO_3^-)的含量。

检测原理

一氧化氮(NO)化学性质活泼，在体内很快代谢为亚硝酸盐(NO_2^-)和硝酸盐(NO_3^-)，而 NO_2^- 又进一步转化为 NO_3^- 。本试剂盒利用还原剂将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ，经显色剂显色在 540 nm 可以测定出硝酸盐含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	沉淀剂 (Precipitant Agent)	4 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	还原剂 (Reductant Agent)	粉剂×2 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酸溶液 (Acid Solution)	11 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	8 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	8 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	1 mL×1 支	2-8℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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(530-550 nm，最佳检测波长 540 nm)，涡旋混匀仪

试剂：PBS (0.01 M, pH 7.40)，2 mol/L NaOH

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。
- ② 试剂二工作液的配制：
取一瓶试剂二加入3 mL的试剂三溶解完全，试剂二工作液2-8℃下可避光保存2天。
- ③ 100 μmol/L标准品的配制：
将试剂六：双蒸水按体积比1：9配制，按需配制，100 μmol/L标准品2-8℃下可避光保存3天。
- ④ 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	50	70	100
100 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	120	160	200	280	400
双蒸水(μL)	400	360	320	280	240	200	120	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)、尿液、细胞上清：按照样本：试剂一 = 5：1的体积比至少涡旋2 min混匀得到样本液，再按照样本液：2 mol/L NaOH = 20：1的体积比(如120 μ L的样本加入6 μ L的2 mol/L NaOH)，涡旋混匀2 min以上。4°C，10000 $\times$ g，离心10 min，取上清置于冰盒上待测，制备好的上清液-20°C保存，在2天内使用为宜。

组织样本：按照组织样本质量(g)：PBS (mL) = 1:9的比例匀浆(如0.1 g组织样本，加入0.9 mL PBS)，4°C，10000 $\times$ g，离心10 min，取上清。按照上清液：试剂一 = 5：1的体积比至少涡旋2 min混匀得到样本液，再按照样本液：2 mol/L NaOH = 20：1的体积比(如120 μ L的样本加入6 μ L的2 mol/L NaOH)，涡旋混匀2 min以上。4°C，10000 $\times$ g，离心10 min，取上清置于冰盒上待测，制备好的上清液-20°C保存，在2天内使用为宜。

细胞样本：收集 1×10^6 个细胞，加入0.2 mL的PBS匀浆，4°C，10000 $\times$ g，离心10 min，取上清。按照上清液：试剂一 = 5：1的体积比至少涡旋2 min混匀得到样本液，再按照样本液：2 mol/L NaOH = 20：1的体积比(如120 μ L的样本加入6 μ L的2 mol/L NaOH)，涡旋混匀2 min以上。4°C，10000 $\times$ g，离心10 min，取上清置于冰盒上待测，制备好的上清液-20°C保存，在2天内使用为宜。

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：0.68-100.00 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	小鼠尿液样本	10-20
大鼠血清	不稀释	10%蒜苔组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	小鼠血浆	不稀释
细胞上清	不稀释	1×10 ⁶ 个 HL-60 细胞	不稀释
1×10 ⁶ 个 Jurkat 细胞	不稀释	1×10 ⁶ 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	1-2	10%小鼠肝组织	1-2

注：稀释液为 PBS (0.01 M, pH 7.40)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 100 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 100 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 100 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
空白对照孔：取 100 μL 双蒸水加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔和测定孔加入 100 μL 试剂二工作液。
向步骤①中的对照孔和空白对照孔加入 100 μL 试剂三。
- ③ 向步骤②的各孔中加入 50 μL 的试剂四；
- ④ 向步骤③的各孔中加入 50 μL 的试剂五；
- ⑤ 振板 5 s，37°C 孵育 60 min，酶标仪于 540 nm 处检测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔	空白对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	100	--	--	--
待测样本(μL)	--	100	100	--
双蒸水(μL)	--	--	--	100
试剂二工作液(μL)	100	100	--	--
试剂三(μL)	--	--	100	100
试剂四(μL)	50	50	50	50
试剂五(μL)	50	50	50	50
振板 5 s，37°C 孵育 60 min，酶标仪于 540 nm 处检测各孔 OD 值。				

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

① 血清(浆)、尿液、细胞上清中硝酸盐含量计算:

$$\text{硝酸盐含量 } (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A_{540} - b) \div a \times f$$

② 组织样本中硝酸盐含量计算公式:

$$\text{硝酸盐含量 } (\mu\text{mol/kg wet weight}) = (\Delta A_{540} - b) \div a \div m \times v \times f$$

③ 细胞样本中硝酸盐含量计算公式:

$$\text{硝酸盐含量 } (\text{nmol}/10^6) = (\Delta A_{540} - b) \div a \div n \times v \times f$$

注解:

ΔA_1 : $A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ (测定孔 OD 值-空白孔 OD 值, 空白孔 OD 值为标准品为 0 时的 OD 值)

ΔA_2 : $A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}}$ (对照孔 OD 值-空白对照孔 OD 值)

ΔA_{540} : $\Delta A_1 - \Delta A_2$

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

m: 样本质量, g

v: 加入的匀浆液的体积, mL

n: 细胞样本的个数, 10^6

f: 样本加入检测体系前稀释的倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

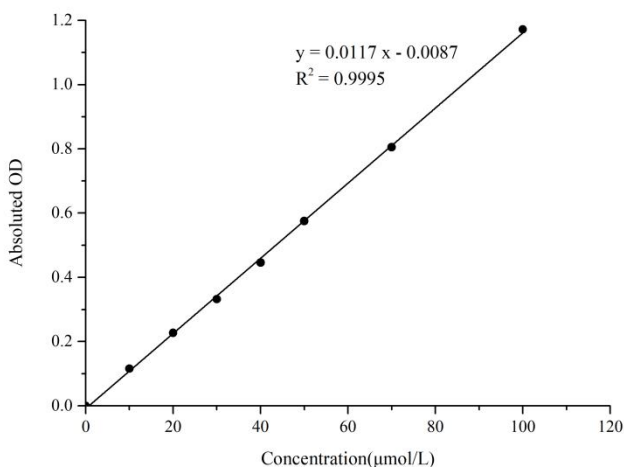
检测范围	0.68-100.00 $\mu\text{mol/L}$	批间差	7.8-9.3%
灵敏度	0.68 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.2-3.8%
加标回收率	94-98%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量为100 μL ，按照操作表进行操作记录OD值，结果如下：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	30	40	50	70	100
OD 值	0.109	0.231	0.345	0.447	0.558	0.684	0.931	1.299
	0.117	0.226	0.335	0.443	0.560	0.692	0.905	1.270
平均 OD 值	0.113	0.229	0.340	0.445	0.559	0.688	0.918	1.285
绝对 OD 值	0	0.116	0.227	0.332	0.446	0.575	0.805	1.172

② 绘制标准曲线，如下图所示：



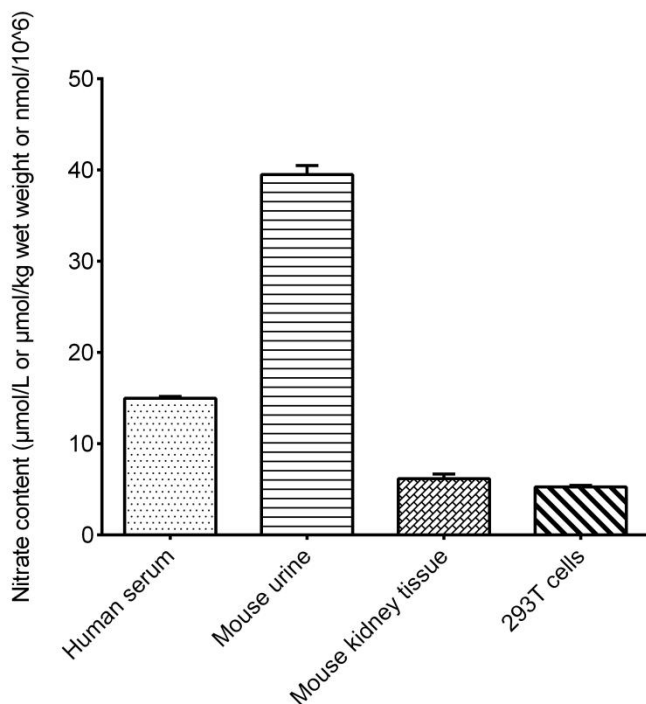
附录2 实例分析

例如人血清(数据仅供参考):

取100 μL 处理后的人血清样本加入到酶标板孔中, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0117x - 0.0087$, 测定孔OD值 $A_{\text{测定}}$ 为0.305, 空白孔OD值 $A_{\text{空白}}$ 为0.113, 对照孔OD值 $A_{\text{对照}}$ 为0.070, 空白对照孔OD值 $A_{\text{空白对照}}$ 为0.044, $\Delta A_1 = 0.305 - 0.113 = 0.192$, $\Delta A_2 = 0.070 - 0.044 = 0.026$, $\Delta A_{540} = 0.192 - 0.026 = 0.166$, 计算结果为:

$$\text{硝酸盐含量 } (\mu\text{mol/L}) = (0.166 + 0.0087) \div 0.0117 = 14.932 \mu\text{mol/L}$$

按说明书操作, 测定人血清(加样量100 μL)、小鼠尿液(稀释10倍, 加样量100 μL)、10%小鼠肾组织(稀释2倍, 加样量100 μL)和293T细胞(1×10^6 , 加样量100 μL)中测定硝酸盐含量(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。

