

(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-K895-M**

**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](http://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( $\text{NO}_3^-$ )的含量。

## 检测原理

一氧化氮( $\text{NO}$ )化学性质活泼,在体内很快代谢为亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )和硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ ),而 $\text{NO}_2^-$ 又进一步转化为 $\text{NO}_3^-$ 。本试剂盒利用还原剂将 $\text{NO}_3^-$ 还原为 $\text{NO}_2^-$ ,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°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	还原剂 (Reductant Agent)	粉剂×3 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酸溶液 (Acid Solution)	11 mL×1 瓶	2-8°C 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°C 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°C 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°C 避光 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(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  $\mu$ L的样本加入6  $\mu$ L的2 mol/L NaOH)，涡旋混匀2 min以上。4  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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  $\mu$ L的样本加入6  $\mu$ L的2 mol/L NaOH)，涡旋混匀2 min以上。4  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C保存，在2天内使用为宜。

细胞样本：收集 $1 \times 10^6$ 个细胞，加入0.2 mL的PBS匀浆，4  $^{\circ}$ 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  $\mu$ L的样本加入6  $\mu$ L的2 mol/L NaOH)，涡旋混匀2 min以上。4  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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  $\mu\text{mol/L}$ ，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	$1 \times 10^6$ 个 HL-60 细胞	不稀释
$1 \times 10^6$ 个 Jurkat 细胞	不稀释	$1 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。  
测定孔：取 100  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标孔中。  
对照孔：取 100  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标孔中。  
空白对照孔：取 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  试剂二工作液。  
向步骤①中的对照孔和空白对照孔加入 100  $\mu\text{L}$  试剂三。
- ③ 向步骤②的各孔中加入 50  $\mu\text{L}$  的试剂四；
- ④ 向步骤③的各孔中加入 50  $\mu\text{L}$  的试剂五；
- ⑤ 振板 5 s, 37  $^{\circ}\text{C}$  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( $\mu\text{L}$ )	100	--	--	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	100	100	--
双蒸水( $\mu\text{L}$ )	--	--	--	100
试剂二工作液( $\mu\text{L}$ )	100	100	--	--
试剂三( $\mu\text{L}$ )	--	--	100	100
试剂四( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50
试剂五( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 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:

$\Delta A_1$ :  $A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$  (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)

$\Delta A_2$ :  $A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}}$  (对照孔 OD 值-空白对照孔 OD 值)

$\Delta A_{540}$ :  $\Delta A_1 - \Delta A_2$

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

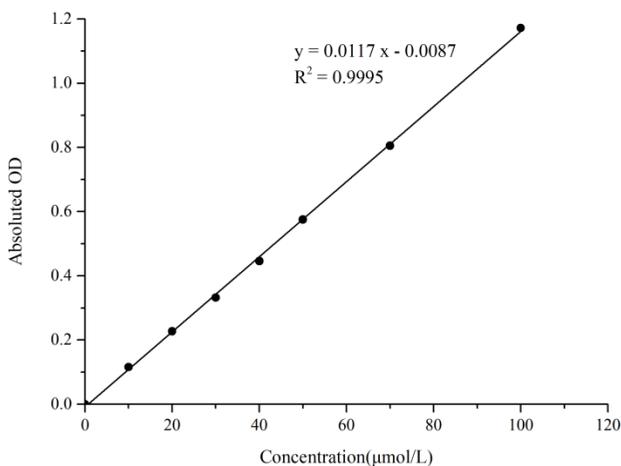
检测范围	0.68-100.00 $\mu\text{mol/L}$	批间差	7.8-9.3%
灵敏度	0.68 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.2-3.8%
加标回收率	94-98%		

### 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  $\mu\text{L}$ ，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：



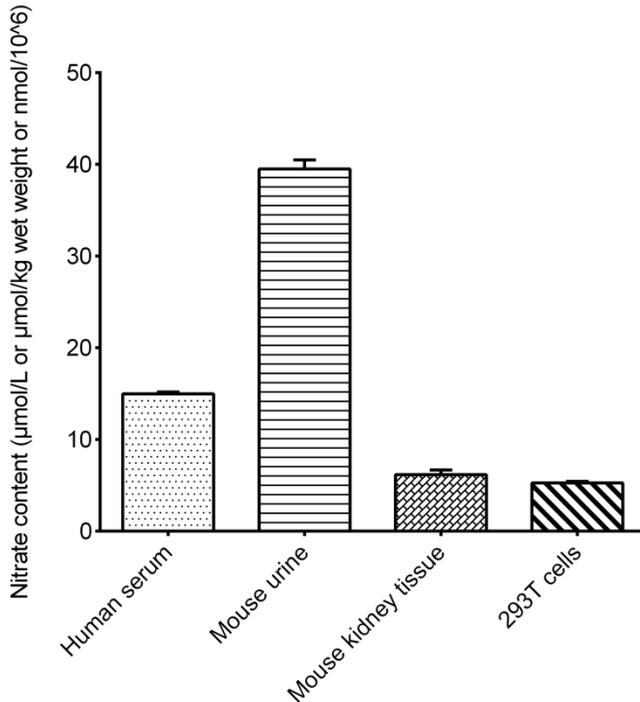
## 附录2 实例分析

例如人血清(数据仅供参考):

取100  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ )、小鼠尿液(稀释10倍,加样量100  $\mu\text{L}$ )、10%小鼠肾组织(稀释2倍,加样量100  $\mu\text{L}$ )和293T细胞( $1 \times 10^6$ ,加样量100  $\mu\text{L}$ )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。



