

一氧化氮（NO）测定试剂盒说明书（精简版）

（货号：A013-1-1 化学法 100 管/96 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

一、测定原理：

NO 遇氧及水生成硝酸盐及亚硝酸盐，后者遇硝酸盐显色剂可生成淡红色偶氮化合物，通过比色可间接测知 NO 浓度。

二、所需仪器耗材及试剂：

含 550nm 波长的分光光度计及 0.5cm 光径比色皿（或酶标仪及 96 孔板）、37℃ 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）。

三、试剂组成及配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：溶液，100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：溶液，50mL×1 瓶，室温或 4℃ 保存。

试剂三：粉剂，用时加蒸馏水 30mL 60℃ 加热至溶解，4℃ 避光保存。（用完剩余部分存放一段时间后下次使用时如有结晶可再加热使其溶解）

试剂四：粉剂，用时加蒸馏水 12mL 溶解，4℃ 避光保存。

试剂五：溶液，12mL×1 瓶，4℃ 或室温保存。

显色剂的配制：按试剂三：试剂四：试剂五=2.5：1：1，现用现配，配好的显色剂可 4℃ 保存，颜色变深后不可再用。

2mmol/L 亚硝酸钠标准液 1mL 一支，4℃ 保存。20μmol/L

亚硝酸钠标准液配制：取 2mmol/L 亚硝酸钠标准液 0.1mL 加双蒸水定容到 10mL，现用现配。

四、操作步骤：

1、样本前处理：

①、**组织样本：**准确称取待测组织的重量，按重量（g）：体积（mL）=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质（推荐 0.1mol/L 且 pH 值为 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液或 0.9% 的生理盐水），冰水浴条件机械匀浆，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液（10% 匀浆上清）待测。（注：匀浆上清需同步测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本所有售）

②、**血清（浆）样本：**直接使用。

③、**其它体液样本：**直接使用（未知浓度时需预试以调整其浓度在）。

2、操作表：

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水（mL）	0.1		
20μmol/L 亚硝酸钠（mL）		0.1	
样品（mL）			0.1
试剂一（mL）	0.8	0.8	0.8
试剂二（mL）	0.4	0.4	0.4
混匀后放置 10 分钟，3500~4000 转/分，离心 10 分钟，取澄清的上清液。			
上清液（mL）	0.8	0.8	0.8
显色剂（mL）	0.4	0.4	0.4
混匀，15 分钟后，550nm 比色，0.5cm 光径比色杯，水调零，测各管 OD 值			

五、计算：

血清计算公式：

$$\text{血清（浆）NO 含量（}\mu\text{mol/L）} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

组织计算公式：

$$\text{组织中 NO 含量（}\mu\text{mol/gprot）} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

$$\text{组织中 NO 含量（}\mu\text{mol/g 组织）} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

C_{标准}：亚硝酸钠标准液浓度，20μmol/L；

N：样本测试前稀释倍数；

Cpr：组织匀浆液蛋白浓度，gprot/L（prot 指蛋白）；

W：组织重量，g；

V_{样总}：样本匀浆时的总体积（约等于匀浆时加入的匀浆介质总体积），L。

查标准曲线计算：

标准曲线的制备：按下表制备亚硝酸钠系列溶液。（带标准品，标准曲线可以不做。）

相当于 NOμmol/L	0	5	10	20	40	80
2mmol/L 亚硝酸钠溶液（μL）	0	10	20	40	80	160
双蒸水（μL）	4000	3990	3980	3960	3920	3840

每一浓度取 0.1mL 按测定步骤进行，以测得的吸光度为纵坐标，浓度为横坐标，作标准曲线，以测得的吸光度查坐标图上相对应的浓度。

六、操作注意点：

- 1、严格按照操作规程。
- 2、可以用一次性塑料试管或用清洗十分干净的玻璃管。
- 3、离心后的上层液一定要澄清，若有混浊要再次离心。
- 4、溶血及混浊血清对测定结果有影响。
- 5、血清及组织块零下冷冻后可保存半月左右。温度越低保存时间越长。零上 4~5℃ 保存三天。
- 6、所有试剂配制可以在测试前一天配制，目的使其充分溶解。在测试过程中，第一次吸的试剂要丢弃，样品和试剂要垂直加入试管，不要加在管壁上（因试剂及样品量小）。离心前要用旋涡混匀器充分混匀，至少放置 10 分钟以上。

七、测定意义：

一氧化氮 NO（即血管内皮舒张因子），在生物体内作为一种反应性极强的自由基，兼有第二信使和神经递质作用，同时又是一种效应分子，在体内具有广泛的生理作用，如松弛血管平滑肌，抑制血小板聚集，调节脑血流，介导细胞毒效应和免疫调节，参与学习和记忆、动脉粥样硬化等作用。NO 产生异常与某些疾病的发生发展有着密切关系。因此，近年来对 NO 的研究越来越受到广大医学科学工作者的重视。

NO 本身半衰期极短，血液中的 NO 主要由血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、血小板、巨噬细胞等产生以硝酸盐及亚硝酸盐的形式存在，通过其浓度可以间接测知 NO 浓度。