

一氧化氮（Nitric oxide, NO）含量测定试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

NO（Nitric Oxide, NO）广泛分布于生物体内神经、循环、呼吸、消化、泌尿生殖等系统中，特别是神经组织中较丰富。它作为细胞间及细胞内的信息物质，发挥信号传递的作用，是一种新型的生物信使分子，在机体的生理、病理过程中起着重要的作用。

测定原理：

NO在体内或水溶液中极易氧化生成NO<sub>2</sub>，在酸性条件下，NO<sub>2</sub>与重氮盐磺酰胺生成重氮化合物，进一步与萘基乙烯基二胺偶合，产物在550nm处有特征吸收峰，测定其吸光值，可以计算NO含量。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵或匀浆器、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。（用之前60℃加热震荡15min）

样品处理：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心15min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4℃，离心15min，取上清置于冰上待测。
3. 体液和培养液等其它液态样品：直接测定。

测定步骤和操作表：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm。
2. 操作表

	空白管	测定管
样品（μL）		100
提取液（μL）	100	
试剂一（μL）	50	50
试剂二（μL）	50	50
混匀，室温静置15min，于微量石英比色皿/96孔板，测定A550， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

NO含量计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为:  $y = 0.016x - 0.0103$ ,  $R^2 = 0.9986$

1、组织样品:

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3} \\ &= 0.125 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 10^{-3} \\ &= 0.125 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、细胞:

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \\ &= 0.125 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

3、其他样品:

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \\ &= 125 \times (\Delta A + 0.0103) \end{aligned}$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 反应中样品体积, 0.1mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为:  $y = 0.008x - 0.0103$ ,  $R^2 = 0.9986$

1、组织样品:

(1) 按样本重量计算

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3} \\ &= 0.25 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 10^{-3} \\ &= 0.25 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、细胞:

$$\begin{aligned} \text{NO含量} (\mu\text{mol}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \\ &= 0.25 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

3. 其他样品:

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 250 \times (\Delta A + 0.0103)$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 反应中样品体积, 0.1mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL

