

## 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  $\text{NO}_2^-$ ，在酸性条件下， $\text{NO}_2^-$  与重氮盐磺胺生成重氮化合物，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。(用之前震荡溶解后使用)

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 ( $10^4$  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 $A_{550}$ ， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

### 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

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

$$= 0.125 \times (\Delta A + 0.0103) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3}$$

$$= 0.125 \times (\Delta A + 0.0103) \div C_{\text{pr}}$$

2、细胞:

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0103) \div 0.016 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \\ = 0.125 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

3、其他样品:

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

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

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

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

2、细胞:

$$\text{NO 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0103) \div 0.008 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \\ = 0.25 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

3、其他样品:

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

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