

亚硝酸盐测定试剂盒

(货号: BC022 比色法 100 管/96 样)

一、试剂配制: (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, 4℃保存。

试剂三:粉剂×1 支, 用时加 60℃以上的双蒸水 30mL, 充分溶解, 4℃避光保存。

试剂四:粉剂×1 支, 用时加双蒸水 12mL, 充分溶解, 4℃避光保存。

试剂五:溶液 12mL×1 瓶, 室温保存或 4℃保存。

显色剂的配制: 试剂三: 试剂四: 试剂五=2.5 : 1 : 1, 配好的显色剂放 2℃-8℃避光保存, 颜色变成深褐色后不可再用。如需多次使用, 使用时注意观察有无结晶, 如有结晶需 60℃以上加热使其溶解后再冷却至室温使用。

2mmol/L 亚硝酸钠标准液: 1mL×1 支, 4℃保存。(制作标曲用)

100μmol/L 亚硝酸钠标准液: 10mL×1 支, 4℃保存。

二、操作步骤:

(一)、样本前处理:

血清(浆)等液体样本: 直接使用。

细胞培养液: 吸取部分 4000 转/分离心 5 分钟, 取上清检测。

动物组织样本: 准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度,蛋白测定试剂盒本公司有售)待测。

植物组织样本: 方法一是先将植物组织用 PBS 擦洗干净,再用吸水纸吸干,后剪碎放入研钵中,液氮研磨成粉,称取植物粉末,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的 PBS,涡旋震荡(或研磨仪研磨)1 分钟,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测;方法二是在洗净并擦干水分后,直接称重,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的 PBS,冰水浴条件下机械匀浆,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测。(注:一般水分含量较高的植物用方法二来处理,相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

细胞样本: 收集细胞后,每份细胞(细胞数量尽量不要低于 10^6 个,越多越好)加入 0.3mL 的生理盐水(或者 PBS),冰水浴下超声破碎(功率 200-300W,运行 5 秒,间隔 15 秒,反复 3-5 次),4000 转/分离心 10 分钟,取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度,蛋白测定试剂盒本公司有售)待测。

(二) 操作表:

| | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|--|-----|-----|-----|
| 双蒸水 (mL) | a* | | |
| 100μmol/L 亚硝酸钠 (mL) | | a* | |
| 样品 (mL) | | | a* |
| 试剂一 (mL) | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 试剂二 (mL) | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 混匀, 室温静置 10 分钟, 3500 转/分, 常温离心 10 分钟, 取澄清的上清液 0.8mL 显色 | | | |
| 上清液 (mL) | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 显色剂 (mL) | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 混匀, 室温静置 15 分钟后, 550nm 波长比色 | | | |



[注]: a*为取样量、标准品量、双蒸水量 (三者相等), 参考取样量: 血清取样 0.1 ~ 0.4mL; 组织、细胞匀浆液取样 0.5 ~ 0.8mL; 细胞培养液取样 0.5-1mL。

三: 计算公式:

$$\text{液体样本亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

$$\text{动物组织、细胞亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/gprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

$$\text{植物样本亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/g组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

$$\text{细胞样本亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/万个细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

$C_{\text{标准}}$ 为标准液浓度, 100 $\mu\text{mol/L}$;

N 为样本测试前稀释倍数;

Cpr 为组织或细胞匀浆液蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);

W 为样本质量, g;

$V_{\text{样总}}$ 为样本前处理时的溶液总体积 (约等于加入的提取液的总体积), L;

细胞总数: 收集好的细胞的总数量, 万个。

注: 动物组织也可参考植物的计算公式, 细胞两种计算方式选其一即可。

四、操作注意点:

- 1、 严格按照操作规程。建议使用一次性实验用塑料试管或离心管操作。
- 2、 离心后的上层液一定要澄清, 若有混浊要再次离心。
- 3、 样本高脂对测定结果有影响 (可在离心前加入样本等体积的氯仿, 涡旋 30-60 秒后再离心)。
- 4、 血清及组织块零下冷冻后可保存半月以上。温度越低保存时间越长。零上 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 可保存三天。
- 5、 试剂配制最好在测试前一天配制, 目的是使其充分溶解。离心前要用旋涡混匀器充分混匀, 至少放置 10 分钟以上。
- 6、 最后比色既可用分光光度计 (配 1ml 比色皿), 也可用酶标仪 (吸取 200 μL 读数)。
- 7、 本试剂盒仅用于科研。

五、测定原理:

亚硝酸盐可与显色剂生成淡红色偶氮化合物, 通过比色可间接测知亚硝酸盐含量。

六、标准曲线制作 (选做):

将 2mmol/L 亚硝酸钠标准品贮备液用蒸馏水稀释成 0、10、25、50、75、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 各个浓度, 按照操作表标准管的加样进行操作, 测得各浓度下的 OD 值, 以各浓度管 OD 值减去 0 管 OD 后 (包含 0 浓度管) 对应各管标准浓度拟合标准曲线, 得出公式计算 (计

算结果代替 $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$ 部分)。

