

一氧化氮 (NO) 测定试剂盒

(货号: BC140 硝酸还原酶法)

一、测定原理:

NO 化学性质活泼, 在体内代谢很快转为 NO_2^- 和 NO_3^- , 而 NO_2^- 又进一步转化为 NO_3^- , 本法利用硝酸还原酶特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 通过显色深浅测定其浓度的高低。

二、测定意义:

NO 化学性质活泼, 体内代谢转化为硝酸盐 (NO_3^-) 和亚硝酸盐 (NO_2^-), 血清(NO_3^-) 与(NO_2^-)浓度之和 ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) 才能准确代表体内 NO 水平。血清 ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) 含量测定, 国内有的单位采用金属镉还原法, 但该法操作繁琐 (血清需除蛋白), 反应不易控制 (金属镉可将 NO_2^- 进一步还原), 且不能完全将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 准确性差。

本测试法为一种灵敏、简便、快速、稳定、易推广的方法。

三、试剂的组成与配制 (试剂盒有效期 6 个月):

| 试剂组成 | 25 管/24 样 | 50 管/48 样 | 保存 |
|---|--|--------------------------------|--------|
| 试剂一 | 液体 6mL×1 瓶 | 液体 6mL×2 瓶 | -20℃以下 |
| 试剂二 | 液体 6mL×1 瓶 | 液体 6mL×2 瓶 | -20℃以下 |
| 混合试剂的配制: 按试剂一: 试剂二=1:1 配制, 充分混合后待用, 用多少配多少, 现用现配 | | | |
| 试剂三 | 液体 6mL×1 瓶 | 液体 12mL×1 瓶 | 4℃ |
| 试剂四 | 液体 3mL×1 瓶 | 液体 6mL×1 瓶 | 4℃ |
| 试剂五 | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | 4℃避光 |
| | 用时每支粉剂加双蒸水 10mL, 加热到 95℃左右充分溶解 | 用时每支粉剂加双蒸水 20mL, 加热到 95℃左右充分溶解 | 室温避光 |
| 试剂六 | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | 4℃避光 |
| | 用时加双蒸水 4mL 室温溶解, 颜色变成深咖啡色不可再用 | 用时加双蒸水 8mL 室温溶解, 颜色变成深咖啡色不可再用 | 4℃避光 |
| 试剂七 | 液体 4mL×1 瓶 | 液体 8mL×1 瓶 | 室温 |
| 显色剂的配制: 按试剂五: 试剂六: 试剂七=2.5:1:1 配。需多少配多少。若在一个月内存用也可一次配成, 剩余显色剂室温避光保存。天冷会有结晶析出, 再次使用时, 放 100℃水浴溶解后使用。 | | | |
| 标准品 (10mmol/L) | 0.5mL×1 支 | 0.5mL×1 支 | -20℃以下 |
| | 100μmol/L 标准品应用液的配制: 取 50μL 10mmol/L 标准液用双蒸水定容稀释至 5mL (即 100 倍稀释), 充分混匀, 现用现配。 | | |
| 双蒸水 | 40mL×1 瓶 | 40mL×2 瓶 | 4℃ |

[注]: 试剂二如需多次使用, 请在第一次解冻后分装保存, 避免反复冻融; 试剂五为过饱和溶液, 所以在配制时最好边加热边用玻璃棒搅拌, 以使其充分溶解。一次实验用不完再使用时可能仍有结晶, 用之前可以再次加热使其溶解。(加热时可隔水加热: 取干净的小烧杯或试剂瓶倒入试剂五粉剂, 再加双蒸水, 再将此小烧杯或试剂瓶放在90-100℃的水浴锅中, 注意千万别把小烧杯或试剂瓶弄翻(可在烧杯或试剂瓶周围用金属物或小石头固定, 防止侧翻))

四、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 0.5cm 光径比色皿 (或酶标仪 (550nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 电炉, 37℃水浴锅 (或恒温箱), 离心机, 烧杯等。

五、操作步骤:

(一)、血清、胃液、尿液、细胞培养液等标本的检测前处理。请参照《实验方法学》:

1、操作表:

| | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|--|-----|-----|-----|
| 双蒸水 (mL) | 0.1 | | |
| 100μmol/L 标准品应用液 (mL) | | 0.1 | |
| 样本 (mL) | | | 0.1 |
| 混合试剂 (mL) | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 混匀, 37℃孵育 60 分钟 | | | |
| 试剂三 (mL) | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 试剂四 (mL) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 充分旋涡混匀 30 秒, 室温静置 40 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清显色。 | | | |
| 上清(mL) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 显色剂 (mL) | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| 混匀, 室温静置 10 分钟, 波长 550nm, 光径 0.5cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值 A (或每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 550nm 处读数)。 | | | |

注: 取上清时, 如果上清量不够, 请延长离心时间, 或者少取一点。例如: 可取 0.4 或 0.45mL, 但您同一批实验所有的管子都应取上清的量要一致, 千万不可将沉淀吸上。

2、计算公式:

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

C_{标准}: 标准液浓度, 100μmol/L;

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

例 1: 取鸡血清 0.1mL 进行检测, 结果如下: 空白管吸光度为 0.020, 标准管吸光度为 0.129, 测定管吸光度为 0.069, 血清未进行稀释, 稀释倍数为 1。则计算为:

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{0.060 - 0.020}{0.129 - 0.020} \times 100 \times 1 = 36.70\mu\text{mol/L}$$

例 2: 取大鼠脑脊液 0.1mL 进行检测, 结果如下: 空白管吸光度为 0.019, 标准管吸光度为 0.125, 测定管吸光度为 0.041, 稀释倍数为 1。则计算结果为:

$$\text{NO含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{0.041 - 0.019}{0.125 - 0.019} \times 100 \times 1 = 20.75\mu\text{mol/L}$$

(二)、组织样本的检测前处理, 请参照《实验方法学》:

1、操作表:

| | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|--|-----|-----|-----|
| 双蒸水 (mL) | 0.5 | 0.4 | |
| 100μmol/L 标准应用液(mL) | | 0.1 | |
| 样本 (mL) | | | 0.5 |
| 混合试剂 (mL) | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 混匀, 37°C 孵育 60 分钟 | | | |
| 试剂三 (mL) | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 试剂四 (mL) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 充分旋涡混匀 30 秒, 室温静置 40 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清显色。 | | | |
| 上清(mL) | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 显色剂 (mL) | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| 混匀, 室温静置 10 分钟, 波长 550nm, 光径 0.5cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值 A (或每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 550nm 处读数)。 | | | |

2、计算公式:

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

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

C_{标准}: 标准品浓度, 20μmol/L (因为标准管中加入 0.4mL 双蒸水和 0.1mL 的 100μmol/L 标准液, 相当于 5 倍稀释所以此处标准浓度为 20μmol/L);

Cpr: 匀浆液蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);

W: 样本质量, g;

V_{样总}: 组织样本匀浆时, 匀浆液的总体积, L。

3、计算举例:

例 1: 取 10%小鼠脑组织匀浆上清 0.5mL 按操作表进行检测, 结果如下: 空白管吸光度为 0.071, 标准管吸光度为 0.156, 测定管吸光度为 0.096, 同时测得 10%匀浆上清蛋白浓度为 4.249gprot/L。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肝NO含量} (\mu\text{mol/gprot}) &= \frac{0.096 - 0.071}{0.156 - 0.071} \times 20 \div 4.249 \\ &= 1.384\mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 2: 取 10%中华鲟脑组织匀浆上清 0.5mL 按操作表进行检测, 结果如下: 空白管吸光度为 0.070, 标准管吸光度为 0.153, 测定管吸光度为 0.132, 同时测得 10%匀浆上清蛋白浓度为 4.533gprot/L。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{中华鲟脑NO含量} (\mu\text{mol/gprot}) &= \frac{0.132 - 0.070}{0.153 - 0.070} \times 20 \div 4.533 \\ &= 3.296\mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

六、最佳参考取样量:

- 1、牛和羊血清取 300μL, 兔和鼠血清取 100μL;
- 2、10%组织匀浆一般取 500μL;
- 3、细胞悬液一般取 500μL, 细胞培养液一般取 100μL。

七、正常参考值:

| 样本 | 参考取样量 | 参考值 |
|------|-------------|-------------------------------|
| 大鼠血清 | 100 μ L | 38.0 \pm 23.4 μ mol/L |
| 小鼠血清 | 100 μ L | 49.96 \pm 23.76 μ mol/L |
| 兔血清 | 100 μ L | 99.16 \pm 39.5 μ mol/L |
| 狗血清 | 100 μ L | 89.51 \pm 32.13 μ mol/L |

八、注意点：

- 1、因组织中 NO 含量较少，组织匀浆一般为 10%或 20%，且做好的组织匀浆离心速度为 2500 转/分，离心 10 分钟，转速不可过高，时间不可太长，样本取样量较大，以 0.3 ~ 0.5mL 左右为宜。
- 2、试剂一、试剂二和标准避免反复冻融，如果需要分批实验（3 次以上），可以在第一次实验时将试剂一、试剂二和标准分装后再保存，根据每次实验时的试剂用量取出待用。配好的显色剂避光保存。
- 3、血清(浆)、组织等标本如不马上检测，应放于-70 $^{\circ}$ C以下保存，半年内有效。
- 4、所有配试剂的双蒸水和空白管中加的双蒸水均要用不含 NO₂⁻的双蒸水或三蒸水。（试剂盒中配有双蒸水）
- 5、在样本与底物反应完毕后，离心，取上清时千万不可将沉淀吸出，否则吸光度会增高很多，明显影响结果真实性。
- 6、试管的选择：
 - ①、用一次性塑料试管或离心管；
 - ②、若用玻璃管,清洗如下:先用洗涤剂泡半个小时以上，煮 0.5-1 个小时，洗刷后，用自来水冲洗 15-20 遍，