

总 NO 检测试剂盒

1 产品基本信息

产品名称（中文）：总 NO 检测试剂盒

产品名称（英文）：Total Nitric Oxide Assay Kits

产品编号：MX1533

产品规格：50 T, 200 T

产品组分

组分	MX1533S (50 T)	MX1533L (200 T)
A. 样品稀释液	4 mL	16 mL
B. NADPH	0.5 mg	2 mg
C. FAD	0.5 mL	2 × 1 mL
D. Nitrate Reductase	250 μL	1 mL
E. LDH Buffer	0.5 mL	2 × 1 mL
F. LDH	0.5 mL	2 × 1 mL
G. 1 M NaNO ₂	250 μL	1 mL
H. Griess Reagent I	2 × 1.25 mL	10 mL
I. Griess Reagent II	2 × 1.25 mL	10 mL

2 产品介绍

NO 作为重要的气体信号分子，广泛存在于生物体内和各个组织中并且参与许多生物效应和生理病理过程，NO 带有自由基，这使它的化学性质非常活泼，在体内迅速氧化生成亚硝酸盐和硝酸盐混合物。本试剂盒基于 Griess 反应的原理，采用优化的反应条件，通过硝酸还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐，从而达到检测总 NO 含量的目的。

产品特点：

- 检测精准：精准定量 NO 含量；
- 适用范围广：可以检测的样品有细胞裂解液、组织裂解液、细胞或组织的培养液、血清、血浆或尿液等中的一氧化氮含量。

适用范围：

NO 定量

3 储存与运输

储存条件：-20 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

4 使用方法（仅供参考）

一、自备材料

1. 耗材

96 孔板细胞培养板

2. 试剂

PBS

3. 仪器

多功能酶标仪

二、操作步骤

1. 样品处理

含有高浓度蛋白的样品如血清或者含有高浓度血清的细胞培养液，在加入 Griess Reagent I 后可能会产生沉淀。如果产生沉淀，则可将样品沸水浴加热 5 min，以变性蛋白，然后 12000 g 离心 5 min，取上清用于后续的测定。对于细胞或组织样品可以用相应的裂解液进行裂解。对于尿液样品，通常需要用水稀释 10~50 倍后检测。不宜使用肝素抗凝的血浆，肝素抗凝的血浆会和 Griess Reagent 反应产生沉淀。

2. 标准品稀释

如果样品为血清，则可以简单地使用 PBS、生理盐水等适当溶液稀释标准品。其他样品稀释标准品所用的溶液要和制备或稀释样品时所用溶液保持一致。稀释的标准品宜现配现用，不宜冻存。

把 1 M NaNO₂ 稀释成 1 μM、10 μM、20 μM、40 μM、80 μM、100 μM 六个浓度。

(1)取 1 M NaNO₂ 标准品 1 μL，加到 1 mL 的稀释液中，得到 1 mM NaNO₂ 溶液。

(2)取 1 mM NaNO₂ 溶液 10 μL，加到 90 μL 的稀释液中，得到 100 μM NaNO₂ 溶液。

(3)取 100 μM NaNO₂ 溶液 80 μL，加到 20 μL 的稀释液中，得到 80 μM NaNO₂ 溶液。

(4)取 80 μM NaNO₂ 溶液，加入等体积稀释液中，得到 40 μM 的 NaNO₂ 溶液。同样方法稀释，得到 10 μM、20 μM NaNO₂ 溶液。

(5)取 20 μM NaNO₂ 溶液 5 μL，加到 95 μL 的样品所用的稀释液中，得到 1 μM NaNO₂ 溶液。

3. 试剂的准备

(1)加约 1.2 mL 双蒸水或 Milli-Q 级纯水至 2 mg NADPH 中，颠倒混匀溶解后，配制成 2 mM NADPH，放置冰浴上使用，余下的 NADPH 溶液须立即分装后-70 °C冻存。

(2)FAD 可以适当分装后-20 °C或-70 °C保存，使用时放置在冰浴上使用。

(3)Nitrate Reductase 和 LDH 应放置在冰浴上使用（注意在使用完毕后 立即-20 °C保存）。Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 在使用前恢复至室温。

(4)参考右侧表格依次加入标准品、样品和检测试剂并进行相应检测。

(5)根据标准品曲线计算出样品中一氧化氮的浓度。

4.标准品、样品和检测试剂

试剂	空白对照	标准品	样品
标准品	-	60 μL	-
样品	-	-	x μL
用于样品稀释的溶液	60 μL	-	(60-x) μL
NADPH (2 mM)	5 μL	5 μL	5 μL
FAD	10 μL	10 μL	10 μL
Nitrate Reductase	5 μL	5 μL	5 μL
混匀后，37 °C 孵育 30 min			
LDH Buffer	10 μL	10 μL	10 μL
LDH	10 μL	10 μL	10 μL
混匀后，37 °C 孵育 30 min			
Griess Reagent I	50 μL	50 μL	50 μL
Griess Reagent II	50 μL	50 μL	50 μL
混匀后，室温(20~30 °C)孵育 10 min 后，测定 540 nm 处吸光度值			

5 常见问题

Q1：检测结果标准曲线良好，但样品吸光度很低，与空白孔相接近是什么原因？该怎么解决？

答：标准曲线良好说明检测试剂盒基本没有问题，样品吸光度低说明样品中 NO 含量很低。

可以采取的解决方案如下：

(1)加大样本和标准品的使用量至 60 μL ，其余用量不变。

(2)浓缩样本，在收集样本的时候尽量使 NO 的浓度保持较高（例如裂解细胞时采用较小体积的裂解液）。另外还可以考虑真空干燥或者真空冷冻干燥的方式浓缩样品。

Q2：检测时发现每个样品的吸光度都非常高是什么原因造成的？

答：在使用 RPMI 1640 培养液时会发生这种情况，因为该培养液中含有较高浓度的硝酸盐从而使样品检测出来的吸光度都非常高，其他含有较高浓度硝酸盐的试剂也会产生类似的情况。

6 注意事项

- 如果 Griess Reagent I 取出时含有沉淀，可将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中，水浴直至沉淀溶解。
- 对于含有较高浓度硝酸盐的培养液，在检测一氧化氮前必须先换成其他适当培养液例如：DMEM、MEM、F12 等，或换成 HBSS 或 PBS 等。因为较高浓度的硝酸盐会对本试剂盒产生干扰。
- 由于检测过程中有还原反应，凡是影响还原反应的氧化或还原试剂要注意避免，例如常用还原剂 DTT 和巯基乙醇。
- 反应必须避光进行，每次加入试剂时，需避免各检测孔中产生气泡，以免气泡干扰检测结果。
- 样品的用量上限为 60 μL ，血清、血浆或组织匀浆液通常使用 40 μL 就足够了。样品不足 60 μL 时，不同样品之间的体积需要保持一致，体积不足的部分用制备或稀释样品时所使用的溶液补足。
- 可以同时设置加入 200 μL 水或 PBS 的 2~3 个孔为阴性对照，这 2~3 个孔仅仅加入水或 PBS，不再加入任何其他试剂。
- 检测时，如无 540 nm 滤光片，520~560 nm 的滤光片也可以使用。
- NADPH, Nitrate Reductase, NaNO_2 , Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 需避光保存。
- NADPH 配制成溶液后须少量分装，并放于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。