

CheKine™ 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1400

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 1-100 μM		灵敏度: 1 μM
	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清 (浆)、尿液 (或其他生物体液)		
	保质期: -20°C, 避光保存 12 个月		

01 背景与原理

一氧化氮 (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, 特别是神经组织中含量较丰富。NO 是一种新型的生物信使分子, 在细胞间及细胞内发挥信号传递的作用。NO 因含有自由基, 易被氧化为 NO_2^- 和 NO_3^- 。因此, 通常要测定 NO_2^- 和 NO_3^- 的总量来推算总 NO 的含量。

本试剂盒检测原理是利用改进的格里斯法将 NO_3^- 还原为 NO_2^- 。在酸性条件下, NO_2^- 与磺胺发生重氮化反应, 生成的重氮盐与 N- (1-萘基) 乙二胺二盐酸盐结合产生紫红色复合物, 测定其在 540 nm 处的吸光度值即可计算样本中 NO 的含量。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Griess Reagent I	4 mL	8 mL	4°C 避光保存
Griess Reagent II	4 mL	8 mL	4°C 避光保存
VCl_3 Reagent	7.5 mL	15 mL	4°C 避光保存
ZnSO_4	0.6 mL	1.2 mL	4°C 避光保存
NaNO_2 Standard (1 M)	1 mL	1 mL	-20°C 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS (pH 7.4)	提取或稀释样本/Standard 用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、 可调式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- RPMI 1640 等含有较高浓度硝酸盐的培养液容易对本试剂盒的检测产生干扰，请尽量避免。必需使用 RPMI 1640 培养液时，在检测一氧化氮前必需先换成其他适当培养液例如 DMEM、MEM、F12 等，或换成 HBSS 或 PBS 等。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本公司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Griess Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	实验过程中避光放置；4℃避光保存
Griess Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	实验过程中避光放置；4℃避光保存
VCl ₃ Reagent	即用型；使用前平衡到室温	实验过程中避光放置；4℃避光保存
ZnSO ₄	即用型；使用前平衡到室温	实验过程中避光放置；4℃避光保存
Standard	使用前平衡到室温	1 M，实验过程中避光放置；分装后 -20℃避光保存

05-1-2 标准品配制

标准曲线设置：取 10 μL NaNO_2 Standard (1 M) 用 990 μL PBS (pH 7.4) 稀释至 10 mM NaNO_2 Standard 储备液 I。取 10 μL 10 mM 的 NaNO_2 Standard 储备液 I 用 990 μL PBS (pH 7.4) 稀释至 100 μM NaNO_2 Standard 储备液 II。用 100 μM Standard 储备液 II 按下表所示，进行下一步稀释。标准品现配现用；稀释后的标准溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

Standard 工作液	100 μM Standard 储备液 II (μL)	PBS (pH 7.4) (μL)	浓度 (μM)
1	200	0	100
2	100	100	50
3	40	160	20
4	20	180	10
5	10	190	5
6	4	196	2
7	2	198	1
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80°C 保存 1 个月。抗氧化剂和亲核剂（例如 β -巯基乙醇、谷胱甘肽、二硫苏糖醇和半胱氨酸）可能会干扰检测。在样品制备过程中避免使用这些化合物。

- 动植物组织或细胞样本：称取约 0.1 g 组织样本或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL PBS (pH 7.4)，冰浴匀浆，14000 rpm， 4°C 离心 10 min，取上清液脱蛋白后用于检测。
- 细菌样本：收集 5×10^6 个细菌，加入 1 mL PBS (pH 7.4)，冰浴超声破碎 5 min（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 14000 rpm， 4°C 离心 10 min，取上清液脱蛋白后用于检测。
- 血浆、血清和尿液（和其他生物体液）：血清、血浆、全血、细胞上清和含有 FBS 的细胞培养基等蛋白丰富的样本需要进行脱蛋白后用于检测；尿液及唾液等蛋白含量较低的样本可直接用于检测。

样本脱蛋白处理流程：将 150 μL 样本与 8 μL ZnSO_4 混合在 1.5 mL EP 管中，旋涡，然后 14000 rpm， 4°C 离心 10 min。将 100 μL 的上清液转移到干净的 EP 管中即获得脱蛋白样本。（脱蛋白操作将对样本产生稀释效果，请在结果计算时考虑此稀释倍数，或对各 Standard 工作液进行相同的脱蛋白流程处理维持相同的稀释倍数。）

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
2. 工作液的配制：每孔需要 200 μL 工作液，为避免损失，按 204 μL 每单孔体系配制：吸取 50 μL Griess Reagent I、50 μL Griess Reagent II 和 104 μL VCl_3 Reagent。工作液需现配现用。
3. 检测体系配制：将 100 μL 稀释的标准品和样本添加到单独标记的 EP 管中（建议样本至少重复测量 2 次）。然后在每个样本和标准管中加入 200 μL 工作液，混合均匀。
4. 反应体系在 37°C 下孵育 30 min。
5. 吸光度检测：将样本反应管 8000 g 离心 1 min 以去除不溶物，并分别从每个反应管中取 250 μL 液体转移到 96 孔板中。在 540 nm 处读取吸光度值，分别标记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 和 $A_{\text{测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$, $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 x 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 x 值 (μM)。

3. 样本 NO 含量计算

● 按样本质量计算

$$\text{NO (nmol/g)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = x \div W \times n$$

● 按细胞或细菌数量计算：

$$\text{NO (nmol/10}^4\text{)} = x \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = x \div 500 \times n$$

● 按液体体积计算

$$\text{脱蛋白处理 NO (nmol/mL)} = x \times V_{\text{液总}} \div V_{\text{液样}} \times n = x \times 1.05 \times n$$

$$\text{直接检测 NO (nmol/mL)} = x \times V_{\text{液样}} \div V_{\text{液样}} \times n = x \times n$$

● 按蛋白浓度数量计算

$$\text{NO (nmol/ mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times n = x \div \text{Cpr} \times n$$

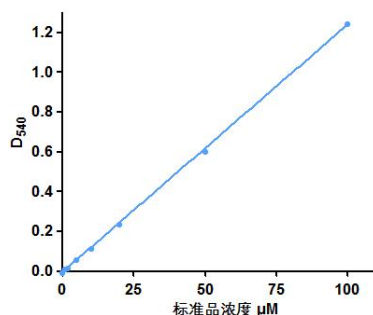
nmol: $1 \mu\text{M} = 1 \text{ nmol/mL}$; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{液总}}$: 液体样本及加入的 ZnSO_4 体积之和, 0.158 mL;

$V_{\text{液样}}$: 液体样本体积, 0.15 mL; n: 样本稀释倍数; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g;

$V_{\text{样总}}$: 样本提取体积, 1 mL; 500: 细胞或细菌数量, 5×10^6 , 以 10^4 为单位。

07 结果展示

典型标准曲线: $y = 0.0124x - 0.002$



示例-1: 取 0.1 g 小鼠肾脏组织, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.3203 - 0.1060 = 0.2143$, 代入标准曲线, 计算 $x = 17.444$ 。按样本质量计算得: $\text{NO (nmol/g)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = x \div W \times n$

=174.44 nmol/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本 $\Delta A_{\text{测定}} > 1.0$ ，则说明样本 NO 含量太高，需用 PBS（pH 7.4）适当稀释（计算公式中乘以相应稀释倍数）。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.005$ ，可提高样本量。

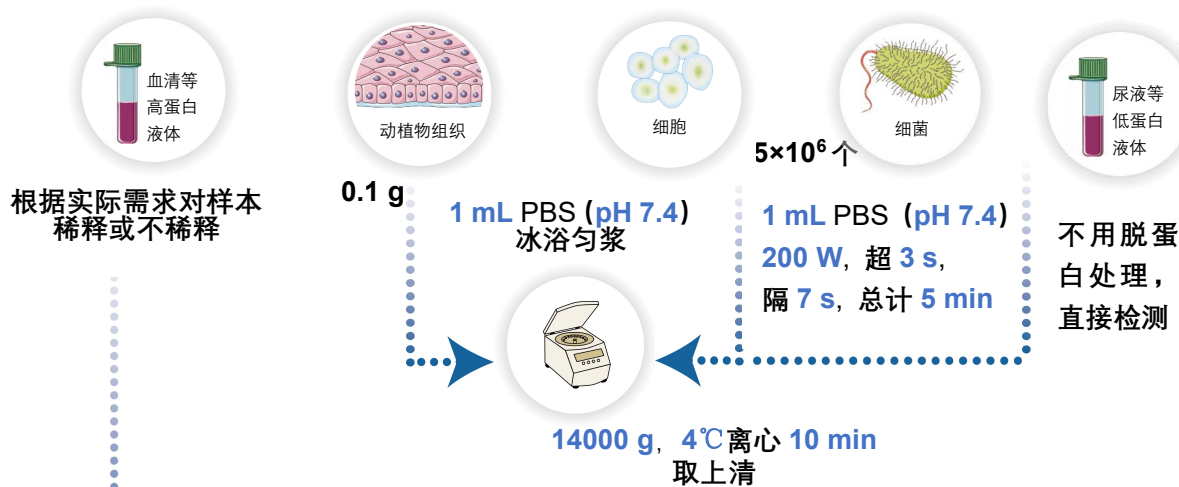
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1010	CheKine™ 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒（微量法）
KTB1020	CheKine™ 辅酶 I NADP (H) 含量检测试剂盒（微量法）
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶 (SOD)活力检测试剂（微量法）
KTB1070	CheKine™ 黄嘌呤氧化酶(XO)活性分析试剂盒（微量法）

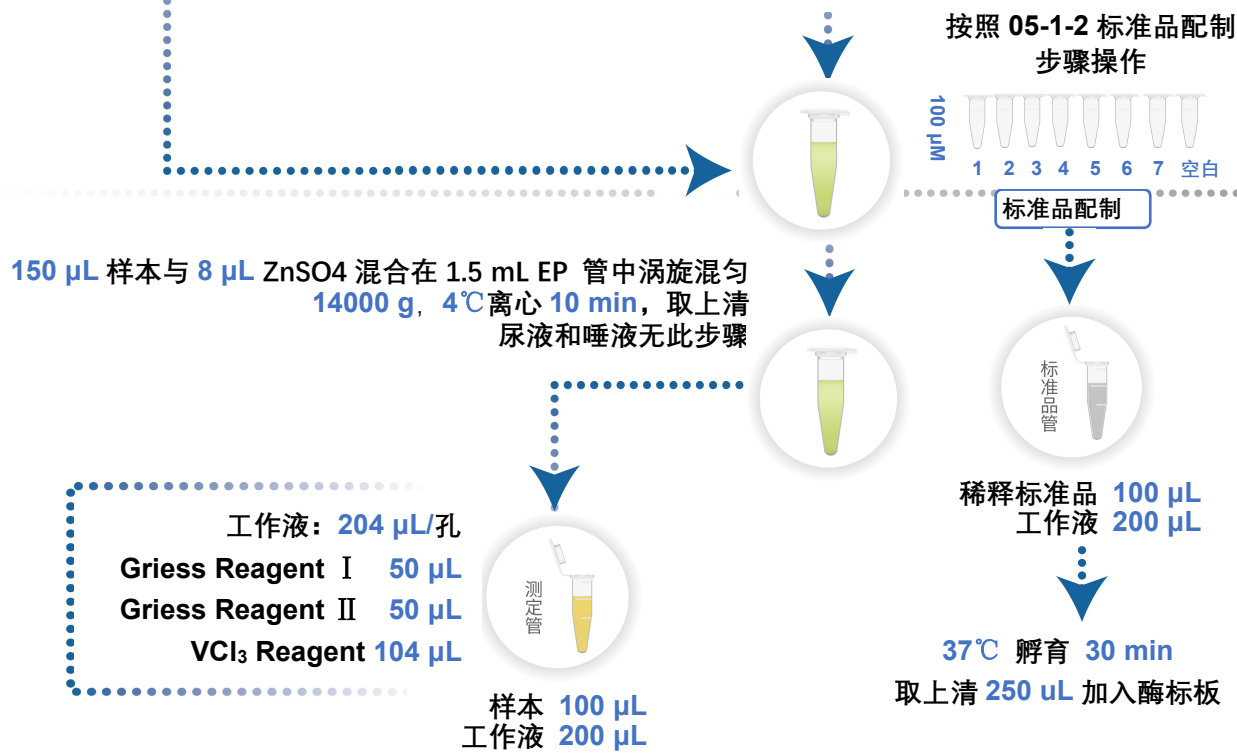
CheKine™ 一氧化氮 (NO) 含量检测流程示意图

(Abbkine 货号: KTB1400)

样本处理



体系配置



数据检测

