

一氧化氮 (NO) 测定试剂盒说明书 (简化版)

(货号: A012-1 硝酸还原酶法)

一、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。

二、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。

三、试剂的组成与配制 (25 管/24 样 A012-1-1):

试剂一: 液体 6ml×1 瓶, -20°C 以下保存 3 个月。用前放 37°C 水浴或室温使溶解后再用。

试剂二: 液体 6ml×1 瓶, -20°C 以下保存 3 个月。用前放 37°C 水浴或室温使溶解后再用。

混合试剂的配制: 按试剂一: 试剂二=1:1 配制, 用多少配多少, 配好后充分混合后待用, 现用现配 24 小时内有效。

试剂三: 液体 6ml×1 瓶, 室温保存 6 个月。

试剂四: 液体 3ml×1 瓶, 室温保存 6 个月。

试剂五: 粉剂×1 支, 用时加 $90^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 热双蒸水 10ml [注 1], 充分溶解, 避光保存。

试剂六: 粉剂×1 支, 用时加双蒸水 4ml, 避光冷藏保存, 当颜色变成深咖啡色不可再用。

试剂七: 液体 4ml×1 瓶, 室温保存 6 个月。

显色剂的配制: 需多少配多少。试剂五: 试剂六: 试剂七=2.5:1:1。若能在一个月内存完者也可一次配成。剩余显色剂置于盛双蒸水的 40ml 方瓶中, 避光保存。天冷会有结晶析出, 再次使用时, 放 100°C 水浴, 反复摇动溶解后使用。

10mmol/L 标准品贮备液: 0.5ml×1 支, -20°C 以下保存 6 个月。

100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品应用液的配制: 取 0.1ml 10mmol/L 标准品贮备液用双蒸水定容稀释至 10ml (即 100 倍稀释), 混匀, 即为 100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品应用液, 现用现配。

另附: 配试剂五、试剂六及标准品的双蒸水 40ml×1 瓶。

[注 1]: 试剂五为过饱和溶液, 所以在配制时最好用 $90^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 的热双蒸水 13ml (热胀冷缩) 边隔水加热边用玻璃棒搅拌, 以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能仍有结晶, 用之前可以再次边隔水加热边玻璃棒搅拌使其溶解。(隔水加热: 取干净的小烧杯倒入试剂五, 再加入 $90^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 的热双蒸水 13ml, 再将此小烧杯放在另一有热水的盆或锅或烧杯中, 注意千万别把小烧杯中的试剂弄翻。这时用玻璃棒将小烧杯中的试剂搅拌溶解, 试剂五溶液一次实验用不完再用时可能仍有结晶, 用之前把盛有试剂五溶液的小烧杯放在另一有热水的盆或锅或烧杯中, 注意千万别把小烧杯中的试剂弄翻。这时用玻璃棒将小烧杯中的试剂搅拌溶解。)

四、试剂的组成与配制（50管/48样 A012-1-2）：

试剂一：液体 6ml×2 瓶，-20℃以下保存 3 个月。用前放 37℃水浴或室温使溶解后再用。

试剂二：液体 6ml×2 瓶，-20℃以下保存 3 个月。用前放 37℃水浴或室温使溶解后再用。

混合试剂的配制：按试剂一：试剂二=1：1 配制，用多少配多少，配好后充分混合后待用，
现用现配 24 小时内有效。

试剂三：液体 12ml×1 瓶，室温保存 6 个月。

试剂四：液体 6ml×1 瓶，室温保存 6 个月。

试剂五：粉剂×1 支，用时加 90℃~100℃热双蒸水 20ml [注 1]，充分溶解，避光保存。

试剂六：粉剂×1 支，用时加双蒸水 8ml，避光冷藏保存，当颜色变成深咖啡色不可再用。

试剂七：液体 8ml×1 瓶，室温保存 6 个月。

显色剂的配制：需多少配多少。试剂五：试剂六：试剂七=2.5：1：1。若能在一个月内存完者也可一次配成。剩余显色剂置于盛双蒸水的 40ml 方瓶中，避光保存。

天冷会有结晶析出，再次使用时，放 100℃水浴，反复摇动溶解后使用。

10mmol/L 标准品贮备液：0.5ml×1 支，-20℃以下保存 6 个月。

100μmol/L 标准品应用液的配制：取 0.1ml 10mmol/L 标准品贮备液用双蒸水定容稀释至 10ml（即 100 倍稀释），混匀，即为 100μmol/L 标准品应用液，现用现配。

另附：配试剂五、试剂六及标准品的双蒸水 40ml×2 瓶。

[注 1]：试剂五为过饱和溶液，所以在配制时最好用 90℃~100℃的热双蒸水 23ml（热胀冷缩）边隔水加热边用玻璃棒搅拌，以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能仍有结晶，用之前可以再次边隔水加热边玻璃棒搅拌使其溶解。（隔水加热：取干净的小烧杯倒入试剂五，再加入 90℃~100℃的热双蒸水 23ml，再将此小烧杯放在另一有热水的盆或锅或烧杯中，注意千万别把小烧杯中的试剂弄翻。这时用玻璃棒将小烧杯中的试剂搅拌溶解，试剂五溶液一次实验用不完再用时可能仍有结晶，用之前把盛有试剂五溶液的小烧杯放在另一有热水的盆或锅或烧杯中，注意千万别把小烧杯中的试剂弄翻。这时用玻璃棒将小烧杯中的试剂搅拌溶解。）

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》：

	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℃准确水浴 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，3500~4000 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。

注意点：1、冬天测试时，所有的试剂均应置于 37℃预热 5 分钟。

- 2、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。

(二)、组织样本的检测前处理，请参照《实验方法学》：

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (ml)	0.5	0.4	
100 μ mol/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 $^{\circ}$ C 准确水浴 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，3500~4000 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。

注意点: 1、冬天测试时，所有的试剂均应置于 37 $^{\circ}$ C 预热 5 分钟。

- 2、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。

六、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，明显影响结果的真实性。
- 6、试管的选择：
 - ①、用一次性塑料试管(建议使用我所的一次性塑料试管)或干净的离心管；
 - 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，甩干，双蒸水冲洗 1-2 遍，烘干。

南京建成生物工程研究所

地 址： 南京市中央路 258-27 号 电 话： (025) 83360321
 新立基大厦 11 层 1106 室 83360969 83113890
 邮 编： 210009 83112287(财务) 83360272(技术电话)
 联 系 人： 季建平 传 真： (025) 83227943 83609960
 投诉电话： (025) 57713719/13813881385 短 信： 13815858329
 建成主页： www.njjcbio.com (建成生物) E-maiL: njjcbio@vip.163.com