

总一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (显色法)

Total Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit

产品编号	产品名称	包装规格
NBS5940-50T	Total Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit	50T
NBS5940-200T	总一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (显色法)	200T

产品简介:

一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 是一种活性基, 在许多关键生理功能中发挥重要作用。一氧化氮, 一氧化氮合酶 (NOS) 催化精氨酸的氧化产物, 参与宿主防御和发育、调节蛋白活化、以及与功能生物分子之间的直接共价相互作用。一氧化氮生成后迅速代谢生成亚硝酸盐 (Nitrite) 和硝酸盐 (Nitrate), 两种首要的、稳定的和非挥发性的裂解产物, 通过对这两种产物的测定能间接反映样本内的一氧化氮水平。

本总一氧化氮检测试剂盒 (Total Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit) 利用两步法测定总一氧化氮水平, 第一步先用硝酸盐还原酶 (Nitrate reductase) 将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 第二步再用经典的 Griess reagent, 对亚硝酸盐进行定量测定, 从而推算出总一氧化氮含量。

由于本试剂盒使用的是 NADPH 依赖的硝酸盐还原酶, 高浓度的 NADPH 会干扰后续检测, 因此, 试剂盒使用乳酸脱氢酶 (LDH) 来清除 NADPH, 确保检测结果的准确性。

本试剂盒以亚硝酸钠为标准品, 通过优化的检测体系, 检测下限达 2 μ M, 且在 2~80 μ M 范围内具有良好的线性关系。本试剂盒不仅能检测细胞、组织或培养液中的一氧化氮含量, 还能检测血清、血浆或尿液中的一氧化氮含量。

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C 保存, 一年稳定。

产品组成:

组分	名称	保存条件	50 次	500 次
NBS5940-A	Sample Diluent 样品稀释液	-20 $^{\circ}$ C	15ml	15ml
NBS5940-B	NADPH	-20 $^{\circ}$ C 避光	5mg	5mg

NBS5940-C	FAD	-20°C	550μl	2.2ml
NBS5940-D	Nitrate Reductase 硝酸盐还原酶	-20°C避光	250μl	1ml
NBS5940-E	LDH Buffer LDH 缓冲液	-20°C	550μl	2.2ml
NBS5940-F	LDH	-20°C	500μl	2ml
NBS5940-G	NaNO ₂ (1M)	-20°C避光	1ml	1ml
NBS5940-H	Griess Reagent I	-20°C避光	3ml	12ml
NBS5940-I	Griess Reagent II	-20°C避光	3ml	12ml

产品使用：

【注意】本试剂盒可用于培养液中的一氧化氮测定，培养液内的酚红和 10%血清对测定无明显干扰。

【注意】样品中存在的一些内在成分可能会干扰测定，导致 OD 值和灵敏度降低。干扰程度依次顺序：尿液>血清>血浆>培养基。

一、需要设备

96 孔酶标仪，最佳波长 540nm，或在 520~560nm 下测定，灵敏度可能会降低。

二、准备步骤

2.1 标准品准备：

每次测量均新做标准曲线，用待测样品所用溶液来稀释标准品，使得浓度在 2~80μM 内。标准品的浓度通常可取 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80μM。

比如：当样品为细胞培养液上清，细胞培养液为 DMEM+10% FBS，则用 DMEM+10% FBS 稀释标准品；当样品为血清，可使用本试剂盒内提供的样品稀释液 (NBS5940-A)，或简单使用 PBS、生理盐水等适当溶液稀释标准品；当样品是用一氧化氮分析用裂解液得到的裂解液，则用此裂解液稀释标准品。

2.2 样品准备：

a) 对于含高浓度蛋白的样品如血清，或含高浓度血清的细胞培养液，加入 Griess reagent I 后可能产生沉淀，可取 50μl 样品，加入 50μl Griess reagent I 进行测试，观察是否产生沉淀。如有沉淀，则把样品沸水浴加热 5min 以变性蛋白，之后 12,000 离心 5min，取上清用于后续的测定。

b) 当样品为组织或细胞，可快速冻融裂解，然后离心沉淀取上清，体积不足 50μl，可用双蒸水、超纯水或 0.9% NaCl 稀释 (相应的标准品也需用双蒸水、超纯水或 0.9% NaCl 稀释)。

细胞或组织也可用一氧化氮分析用裂解液来裂解，同样的，标准品需用此裂解液稀释。

c) 当样品为尿液，通常需用水稀释 10~50 倍后检测。

d) 当样品为血浆，不宜用肝素抗凝的血浆，因其会和 Griess reagent 反应产生沉淀。

2.3 试剂准备

a) 加 1ml 双蒸水或超纯水至 5mg NADPH 中，颠倒混匀使其充分溶解，之后再加 3ml 双蒸水或超纯水定容至 3ml，配制成 2mM NADPH，多余部分按照单次用量分装，立即置于 -70°C 保存。

b) FAD 第一次使用可适当分装后放在 -20°C 或 -70°C 保存。

c) 硝酸还原酶和 LDH 临用前取出，放置在冰浴上使用，使用完毕后需立即放回 -20°C 保存。

d) 试剂盒内的其余各种试剂溶解后保存在冰浴上。

e) Griess reagent I 和 Griess reagent II 使用前需回温至室温。

三、测定步骤

3.1 参考下表依次加入标准品、样品和检测试剂，并进行相应检测：

	空白对照	标准品	待测样品
标准品	/	60μl	/
待测样品	/	/	Xμl
用于样品稀释的溶液	60μl		(60-X) μl
2mM NADPH	5μl	5μl	5μl
FAD	10μl	10μl	10μl
硝酸盐还原酶	5μl	5μl	5μl
	混匀后，37°C 孵育 30min		
LDH Buffer	10μl	10μl	10μl
LDH	10μl	10μl	10μl
	混匀后，37°C 孵育 30min		
Griess Reagent I	50μl	50μl	50μl
Griess Reagent II	50μl	50μl	50μl
	混匀后，室温 (20~30°C) 孵育 10min 后测定 A540		

【注意事项】

- a) 反应必须避光进行。当使用 96 孔板进行检测, 可用铝箔纸包裹 96 孔板进行避光。
- b) 样品的用量上限为 60 μ l。血清、血浆或组织匀浆液通常使用 40 μ l 足够。样品不足 60 μ l, 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所用的溶液补足。
- c) 可同时设置加入 200 μ l 水或 PBS 的 2~3 个孔为阴性对照, 这 2~3 个孔仅加入水或 PBS, 不在加入任何其他试剂。
- d) 加入 Griess reagent I 后需轻轻混匀。
- e) 每次混匀后, 可以 1000~3000g 离心数秒, 把液体沉淀至管底。同时需避免各检测孔中产生气泡, 以免气泡干扰检测结果。

3.2 在 540nm (或 520~560nm) 测定吸光度。需在 30min 内测完, 以防褪色降低灵敏度。

3.3 以标准品浓度为横坐标, 吸光度 OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 获得横纵坐标之间的函数关系式。之后将样品 OD 值代入公式来计总算一氧化氮浓度。

3.4 实际测定时, 由于反应条件、试剂盒批次差异等因素, 会导致检测结果与示例数据存在一定差异。

注意事项:

1. 当检测细胞或组织一氧化氮含量, 不建议使用 RIPA 裂解液, 因其可能在后续实验中产生沉淀, 影响测试。建议使用一氧化氮分析用裂解液 (不含蛋白酶/磷酸酶抑制剂)。也可自行选择适当方式制备组织或细胞样品的裂解液, 要考虑到自行选择的方式是否存在干扰试剂盒内酶反应的可能。
2. 当检测细胞培养液内一氧化氮含量, 不可使用 RPMI1640 等含较高浓度硝酸盐的培养液, 否则会干扰检测。
3. 所有检测反应需避光进行。
4. 由于检测过程存在还原反应, 凡是影响还原反应的试剂都需要避免, 比如 DTT 或 2-ME。
5. 本试剂盒利用的是间接法测定总一氧化氮含量, 如果只需粗略测定一氧化氮相对量, 可选择我司提供的一氧化氮检测试剂盒 (货号: NBS5939-500T)。如果需要直接测定一氧化氮水平, 比如测定细胞内实际的一氧化氮水平, 可选择我司提供的 DAF-FM DA 一氧化氮荧光探针 (货号: NBS5935-100T)。
6. 本试剂盒对人体有害, 请注意适当防护, 避免直接接触人体或吸入体内。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其它用途!

常见问题:

1. 检测结果标准曲线良好，但样品的吸光度很低，和空白对照接近，什么原因？

回复：标准曲线良好说明检测方法和检测试剂盒基本上没有问题，样品吸光度低说明样品中一氧化氮含量很低。可以采取的办法是：1) 加大样品和标准品的使用量至 60 μ l，其余试剂用量不变。2) 把整个检测体系每种试剂的用量加大 50%，这样可以使检测灵敏度增加约 50%。3) 如果上述方法还不能解决问题，可以考虑浓缩样品，即一方面在收集样品的时候尽量使一氧化氮的浓度保持得较高（例如裂解细胞时采用较小体积的裂解液），另一方面可以考虑用真空干燥或真空冷冻干燥的方法浓缩样品。

2. 检测时发现每个样品的吸光度都非常高，什么情况？

回复：使用 RPMI 1640 培养液时会发生这种情况。因 RPMI 1640 培养液中含有高浓度的硝酸盐从而会使样品检测出来的吸光度都非常高。其他含有高浓度硝酸盐的试剂也会产生类似情况，影响氧化还原反应的试剂也可能产生类似干扰。使用过程中避免使用 RPMI 1640 等可能导致干扰检测的试剂即可。

相关产品:

产品编号	产品名称	用途
NBS5870-5mg	Carboxy-PTIO (cPTIO) 一氧化氮 (NO) 清除剂	一氧化氮 (NO) 清除剂
NBS5933-25mg	PTIO 一氧化氮 (NO) 清除剂	一氧化氮 (NO) 清除剂
NBS5934-50ug	DAF-FM DA 一氧化氮(NO)荧光探针(固体粉末)	细胞水平的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5935-100T	DAF-FM DA (5mM in DMSO)一氧化氮 (NO) 荧光探针	细胞水平的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5936-100ug	DAF-2 DA 一氧化氮 (NO) 荧光探针	细胞水平的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5937-100ug	DAF-2 一氧化氮 (NO) 荧光探针	溶液体系的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5938-100ml	Lysis Buffer for Nitric Oxide Assay	一氧化氮 (NO) 分析专用裂解液
NBS5939-500T	Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit	一氧化氮 (NO) (显色法)，定量检测细胞、组织或培养液内的亚硝酸盐量，间接反映一氧化氮水平。
NBS5940-50T	Total Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit	总一氧化氮 (NO) (显色法)，定量检测细胞、组织或培养液内的亚硝酸盐量，间接反映总一氧化氮水平。
NBS5941-25g	Sodium Nitroprusside (SNP)	一氧化氮 (NO) 供体
NBS5942-5mg	S-Nitrosoglutathione (GSNO)	一氧化氮 (NO) 供体