

## Total Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)

### 总一氧化氮(NO)检测试剂盒（比色法）

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Total Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)	50107ES50	50 T
总一氧化氮(NO)检测试剂盒（比色法）	50107ES70	200 T

#### 产品描述

总一氧化氮检测试剂盒（Total Nitric Oxide Assay Kit, 即 Nitrate/Nitrite Assay Kit）采用了硝酸盐还原酶(Nitrate reductase)还原硝酸盐(nitrate)为亚硝酸盐(nitrite), 然后通过经典的 Griess reagent 检测亚硝酸盐, 从而测定出总一氧化氮。一氧化氮本身极不稳定, 在细胞内很快代谢为硝酸盐和亚硝酸盐, 通过上述方法检测出所有的硝酸盐和亚硝酸盐的量, 就可以推算出总的一氧化氮的量。

本试剂盒采用的是 NADPH 依赖性硝酸盐还原酶(NADPH-dependent nitrate reductase)。高浓度的 NADPH 会干扰后续的检测, 因此在 Griess Reagent 检测之前需要消除过量 NADPH 对后续试验的干扰。乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)是常用的 NADPH 消除试剂, 通过其清除作用, 保证了检测结果的准确性。

本试剂盒具有以下特点: 1) 检测灵敏度高: 对亚硝酸盐的检测下限达到 2  $\mu\text{mol/L}$ , 在 2-80  $\mu\text{mol/L}$  的范围内有很好的线性关系。浓度过高的样品可以适当稀释后再进行检测。2) 适用范围广: 对于各种样品的检测, 包括细胞、组织、细胞或组织的培养液、血清、血浆或尿液等。3) 抗干扰能力强: 酚红和 10%血清对测定无明显干扰。4) 样品用量少: 仅需 0-60  $\mu\text{L}$  样品, 取决于样品内一氧化氮的浓度。5) 检测周期短: 仅需约 80 min 即可完成检测。

#### 产品组分

编号	组分	产品货号（规格）		保存方法
		50107ES50 (50 T)	50107ES70 (200 T)	
50107-A	Assay Buffer 反应缓冲液	15 mL	15 mL	-20 °C
50107-B	Enzyme Cofactor 反应辅酶	5 mg	5 mg	-20 °C避光
50107-C	Enzyme Enhancer 反应增强子	550 $\mu\text{L}$	1.1 mL $\times$ 2	-20 °C
50107-D	Nitrate Reductase 硝酸还原酶	250 $\mu\text{L}$	1 mL	-20 °C避光
50107-E	LDH Buffer LDH 缓冲液	550 $\mu\text{L}$	1.1 mL $\times$ 2	-20 °C
50107-F	LDH 乳酸脱氢酶	500 $\mu\text{L}$	1 mL $\times$ 2	-20 °C
50107-G	Nitrite Standard 亚硝酸盐标品(1 M)	1 mL	1 mL	-20 °C避光
50107-H	Griess Reagent I Griess 试剂 I	3 mL	12 mL	-20 °C避光
50107-I	Griess Reagent II Griess 试剂 II	3 mL	12 mL	-20 °C避光

#### 运输和保存方法

冰袋运输。-20 °C保存, 有效期一年。反应辅酶配制成溶液后必须分装并-70 °C保存。

#### 注意事项

- 1) RPMI 1640 等含有较高浓度硝酸盐的培养液易对本试剂盒的检测产生干扰, 请尽量避免。必须使用 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如: DMEM、MEM、F12 等, 或 HBSS 或 PBS 缓冲液等。
- 2) 检测反应必须避光进行。
- 3) 由于检测过程中涉及还原反应, 因此影响还原反应的氧化或还原试剂要注意避免, 如还原剂 DTT 和巯基乙醇。

4) 本产品仅作科研用途!

## 检测步骤

### 1. 样品处理

含有高浓度蛋白的样品如血清、含有高浓度血清的细胞培养液等，在加入 Griess Reagent I 后可能产生沉淀。可取 50  $\mu\text{L}$  样品，加入 50  $\mu\text{L}$  Griess Reagent I 进行测试，观察是否产生沉淀。如产生沉淀，可把样品沸水浴加热 5 min，以变性蛋白，然后 12,000 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使用无蛋白酶或者磷酸酶抑制剂的 RIPA 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，肝素抗凝的血浆在和 Griess Reagent 反应时会产生沉淀。

### 2. 稀释标准品

用制备或者稀释样品所使用的溶液把 1M 亚硝酸盐标准品稀释成 2、5、10、20、40、60、80  $\mu\text{mol/L}$ 。例如样品为细胞裂解液，则用该裂解液稀释标准品；样品为细胞培养液，则用该培养液稀释标准品。如果样品为血清，则可以使用本试剂盒提供的反应缓冲液 (50107-A) 或简单地使用 PBS、生理盐水等适当溶液稀释标准品。

### 3. 试剂的准备

- 加约 1 mL 蒸馏水或 MilliQ 级纯水至 5 mg 反应辅酶(50107-B)中，颠倒混匀溶解后，再用蒸馏水或 MilliQ 级纯水定容至 3 mL，配制成为 2 mM 反应辅酶溶液，除立即使用的部分外，其余反应辅酶溶液必须立即分装后-70  $^{\circ}\text{C}$  冻存。
- 反应增强子(50107-C)已经配制在适当溶液中。反应增强子可以适当分装后-20  $^{\circ}\text{C}$  或-70  $^{\circ}\text{C}$  保存。
- 硝酸还原酶(50107-D)和 LDH (50107-F)在临用前取出，并放置在冰浴上使用（注意在使用完毕后立即-20  $^{\circ}\text{C}$  保存）。试剂盒中的其余各种试剂在溶解后保存在冰浴上。Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 在使用前需达到室温。

### 4. 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	样品
标准品	—	60 $\mu\text{L}$	—
样品	—	—	x $\mu\text{L}$
用于样品稀释的溶液	60 $\mu\text{L}$	—	(60-x) $\mu\text{L}$
反应辅酶 (2mM)	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
反应增强子	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
硝酸还原酶	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
混匀后，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min			
LDH 缓冲液	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
LDH	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
混匀后，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min			
Griess 试剂 I	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Griess 试剂 II	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
混匀后，室温 (20-30 $^{\circ}\text{C}$ ) 孵育 10 min 后测定 A <sub>540</sub> 吸光度值			

**【注】:** a. 反应必须避光进行。如果使用 96 孔板进行检测，可以使用铝箔纸包裹 96 孔板进行避光。

b. 样品的用量上限为 60  $\mu\text{L}$ ，血清、血浆或组织匀浆液通常使用 40  $\mu\text{L}$ 。样品不足 60  $\mu\text{L}$  时，不同样品之间的体积最好能保持一致，体积不足的部分用于样品稀释的溶液补足。用于样品稀释的溶液是指实际用于样品稀释的溶液或裂解样品的溶液。标准品可以参考上表直接使用 60  $\mu\text{L}$ 。

c. 可以同时设置加入 200  $\mu\text{L}$  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。

d. 第一部分 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后，直接参考上表依次加入 LDH 缓冲液和 LDH，并进行后续孵育。

e. 第二部分 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min，直接参考上表依次加入 Griess 试剂 I 和 Griess 试剂 II。加入 Griess 试剂 I 后需要轻轻混匀。

f. 每次混匀后，可以 1000-3000 g 离心数秒，把液体沉淀到管底。同时需避免各检测孔中产生气泡，以免气泡干扰检测结果。

g. 检测时，如无 540 nm 滤光片，520-560 nm 的滤光片也可以使用。如无酶标仪或合适的滤光片，也可以通过数码相机拍照后在适当图形软件中进行定量分析，并确定样品中一氧化氮的浓度。拍照比色时标准品需要更为精细的浓度梯度。

### 5. 根据标准品曲线计算出样品中一氧化氮的浓度。

## 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。

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  $\mu$ 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%。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。对于培养的细胞，通常上清液测定出来的吸光度相对较低，而细胞裂解液测定出来的吸光度会稍高一些。

### 2. 检测时发现每个样品的吸光度都非常高。

在使用 RPMI 1640 培养液时会发生这种情况。因为 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。