

## 一氧化氮（NO）测定试剂盒

微板法：96T

### 一、测定意义及原理

一氧化氮 NO（即血管内皮舒张因子），在生物体内作为一种反应性极强的自由基，兼有第二信使和神经递质作用，同时又是一种效应分子，在体内具有广泛的生理作用，如松弛血管平滑肌，抑制血小板聚集，调节脑血流，介导细胞毒效应和免疫调节，参与学习和记忆、动脉粥样硬化等作用。

NO 产生异常与某些疾病的发生发展有着密切关系。因此，近年来对 NO 的研究越来越受到广大医学科学工作者的重视。

NO 本身半衰期极短，血液中的 NO 主要由血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、血小板、巨噬细胞等产生以硝酸盐及亚硝酸盐的形式存在，通过其浓度可以间接测知 NO 浓度。

NO 遇氧及水生成硝酸盐及亚硝酸盐，后二者遇硝酸盐显色剂可生成淡红色偶氮化合物，通过比色可间接测知 NO 浓度。

### 二、试剂组成及配制：

#### 前处理试剂：

试剂一：液体 20ml×1 瓶，4℃保存一年。

试剂二：液体 10ml×1 瓶，4℃保存一年。

#### 显色试剂：

试剂三：液体 10ml×1 瓶，4℃避光保存。

(过饱和溶液,如有结晶析出, 60°C以上加热溶解完全以后使用)

试剂四: 液体 3ml×1 瓶, 4°C 避光保存。

试剂五: 液体 3ml×1 瓶, 4°C 保存。

显色剂的配制: 试剂三: 试剂四: 试剂五=2.5:1:1, 现用现配, 配好的显色剂放冰箱保存, 颜色变得很深后不可再用。

20 μ mol/L 亚硝酸钠标准液: 2ml×1 支; 2mmol/L 亚硝酸钠标准液: 1ml×1 支, 4°C 保存。

### 三、操作过程:

#### 1. 前处理:

血清(浆): 取血清(浆)原液 100 μl 加试剂一 200 μl, 混匀, 加试剂二 100 μl, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160 μl 操作。组织: 取 10%匀浆上清 300 μl 加试剂一 200 μl, 混匀, 加试剂二 100 μl, 漩涡充分混匀后静置 10 分钟, 3500~4000 转/分钟, 离心 15 分钟, 取上清液 160 μl 操作。

#### 2. 操作表:

|  | 空白孔  | 标准孔  | 测定孔  |
|--|------|------|------|
| 双蒸水 (ml)                                 | 0.16 |      |      |
| 20 μ mol/L 亚硝酸钠标准液 (ml)                  |      | 0.16 |      |
| 上清液 (ml)                                 |      |      | 0.16 |
| 显色剂 (ml)                                 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| 混匀, 静置 15 分钟, 波长 550nm, 酶标仪测定各孔吸光度 OD 值。 |      |      |      |

#### 四、技术参数：

| 项目序号 | 指标名称                    | 指标要求                  |
|------|-------------------------|-----------------------|
| 1    | 试剂盒检出限                  | 0.2 $\mu$ mol/L       |
| 2    | 试剂盒批内 CV                | 2.11%                 |
| 3    | 试剂盒批间 CV                | 5.65%                 |
| 4    | 试剂盒回收率                  | 99.5%                 |
| 5    | 线性范围 0.2~50 $\mu$ mol/L | R <sup>2</sup> =0.999 |
| 6    | 波长选择范围                  | 530nm~570nm           |

#### 六、操作注意点：

- 1、严格按照操作规程。
- 2、离心后的上层液一定要澄清，若有混浊要再次离心。
- 3、溶血及混浊血清对测定结果有影响。
- 4、血清及组织块-20℃冷冻后可保存 1~2 个月。温度越低保存时间越长。零上 4~5℃保存三天。
- 5、培养液的测定参照血清（浆）的操作及计算。

#### 附录 I :标准曲线制备

##### 1、前处理：

用双蒸水将 2mmol/L 亚硝酸钠标准液进行:1:39、1:79、1: 99、1:159、1:319、1:639 稀释。

即亚硝酸钠标准液浓度依次为： 0.05mmol/L、0.025mmol/L、0.02mmol/L、0.0125mmol/L、0.00625mmol/L、0.003125mmol/L

2、操作表:

|   | 空白孔  | 标准孔  |
|---|------|------|
| 双蒸水 (ml)                                | 0.16 |      |
| 不同浓度亚硝酸钠标准液 (ml)                        |      | 0.16 |
| 显色剂 (ml)                                | 0.08 | 0.08 |
| 混匀, 静置 15 分钟, 波长 550nm, 酶标仪测定各孔吸光度 OD 值 |      |      |

3、测定结果

| 标准品浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | 测定 OD 值 | 绝对 OD 值 |
|-----------------------------|---------|---------|
| 0                           | 0.0406  | 0       |
| 3.125                       | 0.0975  | 0.0569  |
| 6.25                        | 0.1581  | 0.1175  |
| 12.5                        | 0.2766  | 0.2360  |
| 20                          | 0.4117  | 0.3711  |
| 25                          | 0.4957  | 0.4551  |
| 50                          | 0.9523  | 0.9117  |

4、绘制图表：

