

亚硝酸盐测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A038-1-1 比色法 100管/96样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,测试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一:溶液 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二:溶液 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三:粉剂×1 支, 用时加 60℃ 以上的双蒸水 30mL, 充分溶解, 4℃ 避光保存。

试剂四:粉剂×1 支, 用时加双蒸水 12mL, 充分溶解, 4℃ 避光保存。

试剂五:溶液 12mL×1 瓶, 室温保存或 4℃ 保存。

显色剂的配制: 试剂三: 试剂四: 试剂五=2.5 : 1 : 1, 配好的显色剂放 2℃-8℃ 避光保存, 颜色变成深褐色后不可再用。如需多次使用, 使用时注意观察有无结晶, 如有结晶需 60℃ 以上加热使其溶解后再冷却至室温使用。

2mmol/L 亚硝酸钠标准液: 1mL×1 支, 4℃ 保存。(制作标准曲线)

100μmol/L 亚硝酸钠标准液: 10mL×1 支, 4℃ 保存。

二、测定原理:

亚硝酸盐可与显色剂生成淡红色偶氮化合物, 通过比色可间接测知亚硝酸盐含量。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS(0.1M)、涡旋混匀器、离心管、电子天平(毫克级)、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

(一)、样本前处理:

血清(浆)等液体样本: 直接使用。

细胞培养液: 吸取部分 4000 转/分离心 5 分钟, 取上清检测。

动物组织样本: 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)待测。

植物组织样本: **方法一**是先将植物组织用 PBS 擦洗干净, 再用吸水纸吸干, 后剪碎放入研钵中, 液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 涡旋震荡(或研磨仪研磨) 1 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测; **方法二**是在洗净并擦干水分后, 直接称重, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

(注: 一般水分含量较高的植物用方法二来处理, 相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

细胞样本: 收集细胞后, 每份细胞(细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好)加入 0.3mL 的生理盐水(或者 PBS), 冰水浴下超声破碎(功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)待测。

(二) 操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	a*		

100μmol/L 亚硝酸钠 (mL)		a*	
样品 (mL)			a*
试剂一 (mL)	0.8	0.8	0.8
试剂二 (mL)	0.4	0.4	0.4
混匀, 室温静置 10 分钟, 3500 转/分, 常温离心 10 分钟, 取澄清的上清液 0.8mL 显色			
上清液 (mL)	0.8	0.8	0.8
显色剂 (mL)	0.4	0.4	0.4
混匀, 室温静置 15 分钟后, 550nm 波长比色			

[注]: a*为取样量、标准品量、双蒸水量(三者相等), 参考取样量: 血清取样 0.1~0.4mL; 组织、细胞匀浆液取样 0.5~0.8mL; 细胞培养液取样 0.5-1mL。

五: 计算公式:

$$\text{液体样本亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

$$\text{动物组织、细胞亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/gprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{植物样本亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/g组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

$$\text{细胞样本亚硝酸盐含量}(\mu\text{mol/万个细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

C_{标准} 为标准液浓度, 100μmol/L;

N 为样本测试前稀释倍数;

C_{pr} 为组织或细胞匀浆液蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);

W 为样本质量, g;

V_{样总} 为样本前处理时的溶液总体积(约等于加入的提取液的总体积), L;

细胞总数: 收集好的细胞的总数量, 万个。

注: 动物组织也可参考植物的计算公式, 细胞两种计算方式选其一即可。

六、操作注意点:

- 1、严格按照操作规程。建议使用一次性实验用塑料试管或离心管操作。
- 2、离心后的上层液一定要澄清, 若有混浊要再次离心。
- 3、样本高脂对测定结果有影响(可在离心前加入样本等体积的氯仿, 涡旋 30-60 秒后再离心)。
- 4、血清及组织块零下冷冻后可保存半月以上。温度越低保存时间越长。零上 2~8℃ 可保存三天。
- 5、试剂配制最好在测试前一天配制, 目的是使其充分溶解。离心前要用涡旋混匀器充分混匀, 至少放置 10 分钟以上。
- 6、最后比色既可用分光光度计(配 1ml 比色皿), 也可用酶标仪(吸取 200μL 读数)。
- 7、本试剂盒仅用于科研。

七、标准曲线制作(选做):

将 2mmol/L 亚硝酸钠标准品贮备液用蒸馏水稀释成 0、10、25、50、75、100、200mmol/L 各个浓度, 按照操作表标准管的加样进行操作, 测得各浓度下的 OD 值, 以各浓度管 OD 值减去 0 管 OD 后(包含 0 浓度管)对应各管标准浓度拟合标准曲线, 得出公式计算(计算结果代替

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \text{ 部分})。$$