

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

亚硝酸盐测定试剂盒 Nitrite Assay Kit

产品货号：BC00040

产品规格：100T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

✉ 邮箱（销售） order@enkilife.cn

✉ 邮箱（技术支持） tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期：请见试剂盒外包装标签。

技术支持：为了更好地给您提供服务，联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	亚硝酸盐测定试剂盒
产品英文名称	Nitrite Assay Kit
检测方法	Colorimetric
样品类型	血清、血浆、动植物组织
检测类型	Quantitative
检测仪器及波长	酶标仪（550 nm）
检测范围	3.125-50μM
灵敏度	1.609μM

产品简介

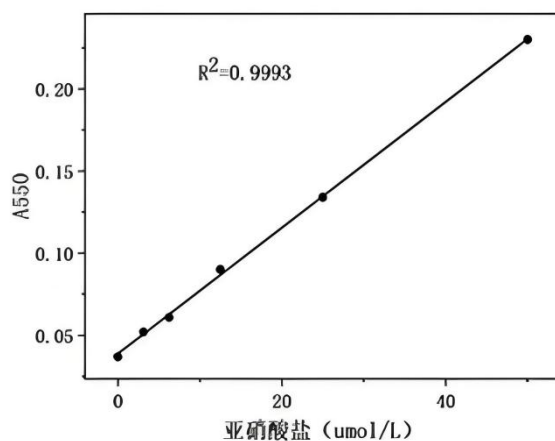
亚硝酸盐广泛存在于人类环境中，是自然界中最普遍的含氮化合物。

检测原理

NO²⁻与显色剂生成淡红色偶氮化合物,生成偶氮化合物的浓度与 NO²⁻的浓度具有线性关系,通过比色法检测可以测定 NO²⁻的浓度。试剂一和试剂二的作用,除去样本有色物质的干扰。在 550nm 处有最大吸收峰,在一定范围内吸光度值与浓度成正比。

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用 EnkiLife 生产的蛋白浓度测定试剂盒(BCA 法)(BC00006)。

下图展示了本试剂盒测定亚硝酸盐的标准曲线。以下标准曲线仅供参考：



产品组分

编号	产品名称	包装规格 (100T)	保存方式
试剂一	盐溶液	50 mL×2 瓶	-20℃，开瓶使用后 2-8℃保存
试剂二	碱溶液	50 mL×1 瓶	-20℃，开瓶使用后 2-8℃保存
试剂三	显色剂 A	粉剂×1 支	-20℃，避光，开瓶使用后 2-8℃保存
试剂四	显色剂 B	粉剂×1 支	-20℃，避光，开瓶使用后 2-8℃保存
试剂五	酸溶液	12 mL×1 瓶	-20℃，开瓶使用后 2-8℃保存
试剂六	亚硝酸钠标准品	粉剂×1 支	-20℃
耗材一	96 孔酶标板	1 板	RT
耗材二	96 孔覆膜	2 张	RT

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。 开瓶使用后可在 4℃保存 6 个月。

实验前准备

• 样品处理

1. 血清血浆等液体样本：可直接测定。
2. 组织样本：常规匀浆处理(匀浆介质为 PBS(0.01 M, pH 7.4)。匀浆后, 4℃, 10000×g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。
3. 样本的稀释：在正式检测前, 需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 选择适当的稀释倍数,

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M, pH 7.4)。

• 试剂盒的准备工作

1. 试剂盒中的试剂平衡至室温。
2. 试剂三工作液的配制：将试剂三粉剂加入 60-70℃的双蒸水 30 mL, 搅拌充分溶解, 2-8℃避光保存 3 个月。
3. 试剂四工作液的配制：将试剂四粉剂加入 12 mL 双蒸水, 搅拌充分溶解, 2-8℃避光保存 2 个月。若试剂出现颜色加深发黑, 舍弃。
4. 显色剂的配制：按试剂三工作液：试剂四工作液：试剂五为 2.5:1:1 的体积比混匀, 现用现配, 2-8℃避光保存 2 天。
5. 2 mmol/L 标准品的配制：取 1 支试剂六用 2mL 双蒸水溶解, 现配现用。
6. 100 μmol/L 标准品的配制：将 2 mmol/L 标准品：双蒸水为 1:19 的体积比混匀, 现用现配。
7. 不同浓度标准品的稀释：将上述配置好的 100 μmol/L 标准品用双蒸水按照对半稀释法稀释成 50、25、12.5、6.25、3.125、0 (空白孔) μmol/L。

操作流程

实验关键点

加入试剂一、二混匀离心后的上清液必须澄清, 若有浑浊要再次离心。

1. 空白管：取 A mL 双蒸水, 加入 2 mL EP 管中;
标准管：取 A mL 100μmol/L 亚硝酸钠标准品, 加入 2 mL EP 管中;

测定管：取 A mL 待测样本，加入 2 mL EP 管中。

(A 为样本的加样量=标准品的加样量 = 双蒸水的加样量；血清（浆）参考取样量：

0.2-0.4 mL，组织匀浆参考取样量 0.1-0.2 mL)

- 向步骤“ 1” 中的各管加入试剂一 0.8 mL，涡旋混匀。
- 向步骤“ 2” 中的各管加入试剂二 0.4 mL，涡旋混匀。
- 室温静置 10 min，2000×g 离心 10 min。（若上清液中含有部分沉淀物，将上清液转入新的 EP 管中，再次离心）
- 分别取 0.1 mL 上清液，加入酶标板各孔中。
- 向步骤“ 5” 中的各酶标孔加入 0.05 mL 显色剂，混匀，室温静置 15 min，波长 550nm 测定 OD 值。

操作表如下：

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	A	--	--
不同浓度的亚硝酸钠标准品 (mL)	--	A	--
待测样本 (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 10min, 2000Xg 离心 10min 取上清液，加入到酶标板中。			
上清液 (mL)	0.1	0.1	0.1
显色剂 (mL)	0.05	0.05	0.05
酶标仪振板 5s，室温静置 15min，波长 550nm 测定各孔 OD 值。			

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

血清（浆）亚硝酸盐浓度计算公式：

$$\text{NO}_2^- \text{含量} \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f$$

(μmol/L)

组织亚硝酸盐浓度计算公式：

$$\text{NO}_2^- \text{ 含量 } (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解：

ΔA_1 ：样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2 ：标准 OD 值-空白 OD 值

c：标准品浓度

f：样本加入检测体系前稀释的倍数

C_{pr} ：待测样本的蛋白浓度 (gprot/L)

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
样本测量结果	样本浓度太高	选择合适稀释倍数, 重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

注意事项

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。

6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。