

[NO₂⁻ + NO₃⁻] 検量線の作成

1) 96 穴マイクロプレートに次のように NaNO₃ 標準溶液を調製する。

* 検量線作成のためのスポット数は、必要に応じて増やしてください (n=3 以上)。

Well	NaNO ₃ 標準溶液 (μl)	緩衝溶液 (μl)	NO ₃ 濃度 (μmol/l)
E1	0	80	0
F1	20	60	25
G1	40	40	50
H1	80	0	100

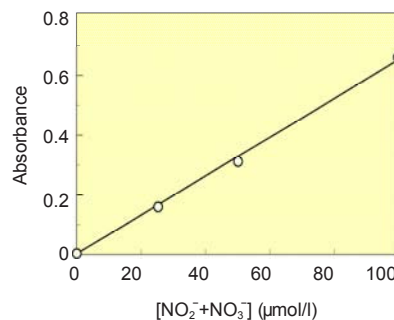


図 2 [NO₂⁻ + NO₃⁻] の検量線の例

- 2) 各ウェルに補酵素溶液 10 μl、酵素溶液 10 μl を入れ、よく混和する。
- 3) そのまま室温 (約 25°C) にて 2 時間インキュベートする。
- 4) 試薬 A 50 μl を加えよく混和して 5 分間放置する。試薬 B 50 μl を加え混和し、10 分間反応後、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定する。
- 5) 得られた値とブランク値 (E1 の値) との差を求める。
- 6) 横軸に NaNO₃ の濃度、縦軸に吸光度をとり、この結果をグラフ化する。

サンプル調製法

- 1) 血清及び血漿などのタンパク質を含む試料は、除タンパクして測定に使用下さい。(Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane ([UFC801008], Millipore 社) などで除タンパク (例えば 7,000 × g, 20 分間, 4°C) して、測定試料として下さい。トリクロロ酢酸などを用いた除タンパクでも結構です。ただし、酸やアルカリで除タンパクした場合は、測定前に必ず pH を中性に戻してから使用して下さい。酵素反応が阻害をうける可能性があります。その他のタンパク質を含む試料も上記と同様に除タンパクを行って下さい。)
- 2) 細胞培養液を測定に用いる場合は培養液を 1,000 × g、15 分間、室温で遠心分離し、その上澄みを測定試料として使用して下さい。
- 3) NO₃⁻ を多く含む培養液 (RPMI1640 など) では [NO₂⁻ + NO₃⁻] の測定はできませんのでご注意下さい。
- 4) 濁りは、測定値に影響を及ぼします。サンプルに濁りがある場合は遠心分離、または濾過により濁りを除いてから測定にご使用下さい。

未知試料の [NO₂⁻] 測定

- 1) 96 穴マイクロプレートの A2 ~ H12 の空いているウェルに各ウェルあたり 80 μl のサンプルを入れる。
- 2) 緩衝溶液 20 μl を加え全量を 100 μl とする。
- 3) 試薬 A 50 μl を加えよく混和し 5 分放置する。試薬 B 50 μl を加え混和し、10 分間反応させた後マイクロプレートリーダーで測定する。
- 4) 得られた値とブランク値 (A1) との差を求める。
- 5) 検量線より [NO₂⁻] 濃度を求める。

未知試料の [NO₂⁻ + NO₃⁻] 測定

- 1) 96 穴マイクロプレートの A2 ~ H12 の空いているウェルに各ウェルあたり 80 μl のサンプルを入れる。
- 2) 補酵素溶液 10 μl、酵素溶液 10 μl を入れ、よく混和する。
- 3) そのまま室温 (約 25°C) にて 2 時間インキュベートする。
- 4) 試薬 A 50 μl を加えよく混和し、5 分間放置する。
試薬 B 50 μl を加え混和し、10 分間反応させた後マイクロプレートリーダーで測定する。
- 5) 得られた値とブランク値 (E1) との差を求める。
- 6) 検量線より [NO₂⁻ + NO₃⁻] 濃度を求める。

未知試料の [NO₃⁻] 測定

本 Kit では [NO₃⁻] のみの値は直接的には得られません。測定試料中の [NO₃⁻] は [NO₂⁻] と [NO₂⁻ + NO₃⁻] を用いて、下記の計算式により求めることができます。

$$[\text{NO}_3^-] = [\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-] - [\text{NO}_2^-]$$

参考文献

- 1) S. Archer, *FASEB. J.*, **1993**, 7, 349.
- 2) W. R. Tracy, J. Linden, M. J. Prach, R. A. Johns, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1990**, 252, 922.
- 3) J. S. Pollock, U. Forstermann, J. A. Mitchell, T. D. Warner, H. H. H. Schmidt, M. Nakane, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1991**, 88, 10480.
- 4) H. H. H. Schmidt, T. D. Warner, M. Nakane, U. Forstermann, F. Murad, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, 41, 615.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル : 0120-489548
フリーファックス : 0120-021557

NK05 : NO₂/NO₃ Assay Kit - C II