Material und Methoden 23

2.6 Nitrit-Bestimmung (NO₂⁻)

Die Bildung von Stickoxid wurde mittels der Griessreaktion über eines seiner Zerfallsprodukte (Übersicht 6), das Nitrit, verifiziert (Hevel & Marletta 1994).

(i)
$$2 \text{ NO}^{\bullet} + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{ NO}_2^{\bullet}$$

(ii)
$$NO^{\bullet} + NO_{2}^{\bullet} \longrightarrow N_{2}O_{3} \xrightarrow{H_{2}O} 2 NO_{2}^{\bullet}$$
oder

(iii) $2 NO_{2}^{\bullet} \longrightarrow N_{2}O_{4} \xrightarrow{H_{2}O} NO_{2}^{\bullet} + NO_{3}^{\bullet}$

Übersicht 6: Zerfallswege des Stickoxids

Dabei kann die Bildung eines Azofarbstoffes aus Nitrit und dem Griessreagenz spektrometrisch beobachtet werden. Dazu wurden aus den Kulturschalen nach vorsichtigem Schütteln 100 µl Medium entnommen und wie folgt bearbeitet:

Griess-Reagenz (frisch herstellen)

- 5 ml Lösung A + 5 ml Lösung B
- A) 0,1 % N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid in Aqua dest.
- B) 1 % Sulfanilamid in 5%iger Phosphorsäure

Eichreihe (Stammlösung 0,1 M (0,69 g NaNO₂ / 100 ml Aqua dest.))

 Verdünnungsreihe (eingefroren etwa 2 Monate haltbar) in Aqua dest. herstellen im Bereich 3 - 250 μM

Reaktion

- 100 µl Probe (Kulturüberstand bzw. NaNO₂-Standard)
- 150 µl Wasser (Nanopure)
- 250 µl Griess-Reagenz
- 10 min bei 37 °C nach Mixen reagieren lassen
- E 543 gegen Leerwert (statt Probe entweder Wasser oder frisches Zellkulturmedium (DMEM)) ablesen