

超氧阴离子(Superoxide anion, OFR)试剂盒

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

生物体内超氧阴离子等活性氧具有免疫和信号传导的作用，但积累过多时会对细胞膜及生物大分子产生破坏作用，导致机体细胞和组织代谢异常，从而引起多种疾病。

测定原理：

超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- ， NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺的作用下，生成红色的偶氮化合物，在 530nm 处有特征吸收峰，根据 ΔA 值可以计算样品中 O_2^- 含量，反应式为 $\text{NH}_2\text{OH} + \text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。

自备实验用品及仪器：

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、氯仿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 110mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：氯仿，自备。

超氧阴离子提取：

1. 植物、动物组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后，10000g，4℃，离心 20min，取上清置于冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min)；然后 10000g，4℃，离心 20min，取上清置于冰上待测。
3. 血清或培养液：直接测定。

测定操作表

- 1、 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 530nm。
- 2、 操作表

超氧阴离子含量计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0242x - 0.0027$, $R^2 = 0.9980$

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \end{aligned}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/g} \cdot \text{min)} = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \div T = 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 2 = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \\ &\div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \div T = 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

2. 细菌, 真菌:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4 \text{ cell} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 血清或培养液

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mL)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mL} \cdot \text{min)} = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div T = 7.44 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.36 mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积, 0.2 mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量, g; T : 反应时间, 20 min; 2: 2 分子 O_2 —参与反应生成 1 分子 NO_2 —。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0121x - 0.0027$, $R^2 = 0.9980$

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2$$

$$= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/g} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \div T = 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

超氧阴离子含量(nmol/mg prot)=($\Delta A+0.0027$) $\div 0.0121 \times V_{反总} \div (V_{样} \times Cpr) \times 2 = 297.52 \times (\Delta A+0.0027) \div Cpr$
超氧阴离子产生速率(nmol/ mg prot • min)= $297.52 \times (\Delta A+0.0027) \div Cpr \div T = 14.88 \times (\Delta A+0.0027) \div Cpr$

2. 细菌, 真菌:

超氧阴离子含量 (nmol/104 cell) = ($\Delta A+0.0027$) $\div 0.0121 \times V_{反总} \div (V_{样} \div V_{样总} \times \text{细胞数量}) \times 2$
= $297.52 \times (\Delta A+0.0027) \div \text{细胞数量}$

超氧阴离子产生速率 (nmol/104 cell • min) = $297.52 \times (\Delta A+0.0027) \div \text{细胞数量} \div T$
= $14.88 \times (\Delta A+0.0027) \div \text{细胞数量}$

3. 血清或培养液

超氧阴离子 含量 (nmol/mL) = ($\Delta A+0.0027$) $\div 0.0121 \times V_{反总} \div V_{样} \times 2 = 297.52 \times (\Delta A+0.0027)$

超氧阴离子产生速率 (nmol/mL • min) = $297.52 \times (\Delta A+0.0027) \div T = 14.88 \times (\Delta A+0.0027)$

$V_{样总}$: 加入提取液体积, 1 mL; $V_{反总}$: 反应总体积, 0.36mL; $V_{样}$: 反应中样品体积, 0.2mL; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量, g; T : 反应时间, 20min; 2: 2 分子 O_2^- 参与反应生成 1 分子 NO_2^- 。

注意事项

- 1、OD 值大于 1, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数。
- 2、样品制备好后, 立刻进行测定, 请勿将样品进行长时间的低温保存, 以免影响测定结果。
- 3、试剂四有一定的毒性, 请操作时做好防护措施。