

超氧阴离子(OFR)含量检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0270	超氧阴离子(OFR)含量检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 110mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 20mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 15mL × 1 瓶	4℃, 避光
试剂三	液体 15mL × 1 瓶	4℃, 避光
试剂四	氯仿, 自备。	

一、产品说明

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。

超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酰胺和 α -萘胺的作用下, 生成红色的偶氮化合物, 在 530nm 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 $\text{NH}_2\text{OH} + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。

二、自备材料

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

三、样品准备

- 1、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。10000g 4℃ 离心 20min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细胞/细菌: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 10000g 4℃ 离心 20min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清或培养液: 直接测定。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 530nm, 蒸馏水调零。
- 2、操作表

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
样本		200
提取液	200	
试剂一	160	160

充分混匀, 37°C 水浴 20min。		
试剂二	120	120
试剂三	120	120
充分混匀, 37°C 水浴 20min。		
试剂四	200	200
充分混匀, 8000g 25°C 离心 5min, 小心吸取上层水相 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中, 测定 A530。ΔA=A 测定-A 空白, 空白管只需做一管。		

五、计算公式

A. 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、按照样本蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 2 \\ &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot min)} &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \div T \\ &= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

2、按照样本鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \\ &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W. \end{aligned}$$

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

3、按照细菌/真菌数量计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4 \text{ ceLL)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量}. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4 \text{ ceLL min)} &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量}. \end{aligned}$$

4、按照血清或培养液体积计算

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

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

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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 O₂⁻ 参与反应生成 1 分子 NO₂⁻。

B. 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、按照样本蛋白浓度计算:

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

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \div T \\ &= 7.448 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

2、按照样本鲜重计算:

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

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

3、按照细菌/真菌数量计算:

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

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

4、按照血清或培养液体积计算

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

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

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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 O₂⁻ 参与反应生成 1 分子 NO₂⁻。

六、注意事项

- 1、每次实验空白管仅需做一管。
- 2、OD 值大于 1, 样品适当稀释再测定, 计算时乘以稀释倍数。
- 3、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。
- 4、试剂四有一定的毒性, 请操作时做好防护措施。