

超氧阴离子(OFR)含量检测试剂盒 (分光光度计法)
(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
YFX0269	超氧阴离子 (OFR) 含量检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 32mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 25mL × 1 瓶	4℃, 避光
试剂三	液体 25mL × 1 瓶	4℃, 避光
试剂四	氯仿, 自备。	
亚硝酸钠标准品: 液体 1mL × 1 支, 10μmol/mL 亚硝酸钠。		4℃

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萘乙二胺盐酸盐的作用下, 生成红色的偶氮化合物, 在 530nm 有特征吸收峰, 根据 A_{530} 值可以计算样品中 O_2^- 含量。

二、自备材料

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、氯仿和蒸馏水。

三、样品准备

- 1、组织: 将样品磨碎, 按照质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液)加入提取液, 充分研磨, 12000rpm 4℃, 离心 20min, 取 20μL 上清测定蛋白含量, 其余上清作为待测样本。
- 2、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、标准溶液的制备: 取适量亚硝酸钠标准液, 首先 16 倍稀释至 0.625μmol/mL, 然后进行倍比稀释至 0.31250、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.0049、0.00244、0.0012、0.0006μmol/mL 梯度稀释的标准溶液, 用 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.00244、0.0006μmol/mL 标准管做标准曲线。

3、操作表

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	标准管
标准溶液			200
样本		200	
提取液	500	300	300
试剂一	400	400	400
混匀, 37°C水浴 20min。			
试剂二	300	300	300
试剂三	300	300	300
混匀, 37°C水浴 20min。			
试剂四	500	500	500
混匀, 8000rpm, 25°C, 离心 5min, 小心吸取上层水相 1mL, 蒸馏水调零, 1mL 玻璃比色皿, 测定 A530。计算ΔA 标准=A 标准管-A 空白管, ΔA 样品=A 测定管-A 空白管。 每次实验空白管仅需做一管。			

五、含量的计算

1、标准曲线的建立: 以ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线 $y=kx+b$; 将 ΔA 样品带入方程得到 x 值 (μmol/mL)。

2、按照样本蛋白浓度计算:

超氧阴离子含量 (μmol/min/mg prot) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) = 2x \div C_{\text{pr}}$ 。

超氧阴离子产生速率 (μmol/ min/mg prot) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.1x \div C_{\text{pr}}$ 。

3、按照样本鲜重计算:

超氧阴离子含量 (μmol/g 鲜重) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) = 2x \div W$ 。

超氧阴离子产生速率 (μmol/ min/g 鲜重) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 0.1x \div W$ 。

4、按照血清或培养液体积计算:

超氧阴离子含量 (μmol/mL) = $2x$

超氧阴离子产生速率 (μmol/min/mL) = $2x \div T = 0.1x$ 。

V 样本: 参与反应样本体积, 0.2mL; V 提取: 提取过程中加入的提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品鲜重, g; T: 反应时间, 20min。

六、注意事项

- 1、OD 值大于 1.0, 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。