

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	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°C
试剂一	液体 12mL ×1 瓶	4°C
试剂二	液体 8mL ×1 瓶	4°C, 避光
试剂三	液体 8mL ×1 瓶	4°C, 避光
试剂四	氯仿, 自备。	
标准品	液体 0.5mL×1 支, 10μmol/mL 亚硝酸钠。	4°C

一、产品说明

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 A530 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/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、组织样本: 称取约 0.1g 样本, 加入提取液 1mL, 充分研磨, 12000rpm, 4°C, 离心 20min, 取 20μL 上清测定蛋白含量, 其余上清作为待测样本。
- 2、血液或培养液: 直接检测。

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、分光光度计或酶标仪预热 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 8 倍稀释至 1.25μmol/mL, 然后进行倍比稀释至 0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.0049、0.00244、0.0012μmol/mL 梯度稀释的标准溶液, 用 0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.0049、0.0012μmol/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			40
样本溶液		40	
提取液	100	60	60

试剂一	80	80	80
混匀, 37°C 水浴 20min。			
试剂二	60	60	60
试剂三	60	60	60
混匀, 37°C 水浴 20min。			
试剂四	100	100	100
混匀, 8000rpm, 25°C, 离心 5min, 小心吸取上层水相 200μL, 蒸馏水调零, 微量玻璃比色皿/96 孔板, 测定 530nm 处吸光值, 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、超氧阴离子含量的计算

1、标准曲线的绘制: 以ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。

2、超氧阴离子含量的计算: 将ΔA 样品带入方程得到 x 值 (μmol/mL)。

3、按照组织样本蛋白浓度计算:

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

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

4、按照组织样本鲜重计算:

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

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

5、按照血清或培养基体积计算:

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = 2x$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = 2x \div T = 0.1x$$

V 样本: 参与反应样本体积, 0.04mL; 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 1.5, 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。