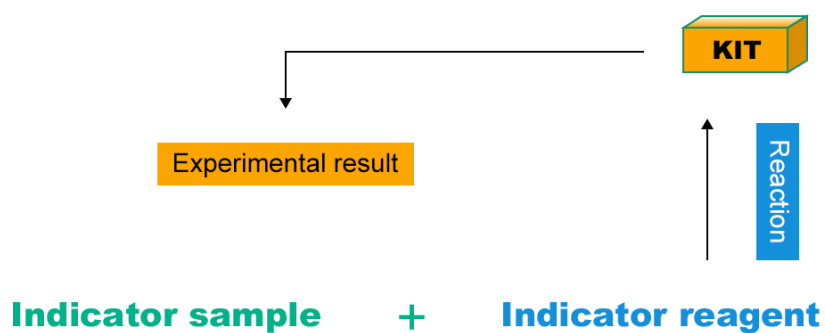


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0349

Size: 100T/96S

超氧阴离子检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品：

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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	氯仿	自备	
亚硝酸钠标准品：液体 0.5mL×1 支，4℃保存。10μmol/mL 亚硝酸钠。			

五、操作步骤：

● 超氧阴离子提取

1. 植物、动物组织：称取约 0.1g 样本，加入提取液 1mL，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。

● 测定操作表

- 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，用蒸馏水首先 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

	空白管	测定管	标准管
标准溶液 (μL)			40
样本 (μL)		40	
提取液 (μL)	100	60	60
试剂一 (μL)	80	80	80
混匀，37℃水浴 20min			
试剂二 (μL)	60	60	60
试剂三 (μL)	60	60	60
混匀，37℃水浴 20min			
试剂四 (μL)	100	100	100
混匀，8000rpm，25℃，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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{样品}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每次实验空白管仅需做一管。			

六、超氧阴离子含量计算公式

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 ($\mu\text{mol/mL}$)

(1) 按照样本鲜重计算

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

(2) 按照蛋白质浓度计算

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

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

(3) 按照血清或培养液体积计算

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $2x$

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

$V_{\text{样本}}$: 参与反应样本体积, 0.04mL; $V_{\text{提取}}$: 提取过程中加入的提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品鲜重, g; T : 反应时间, 20min。

七、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。