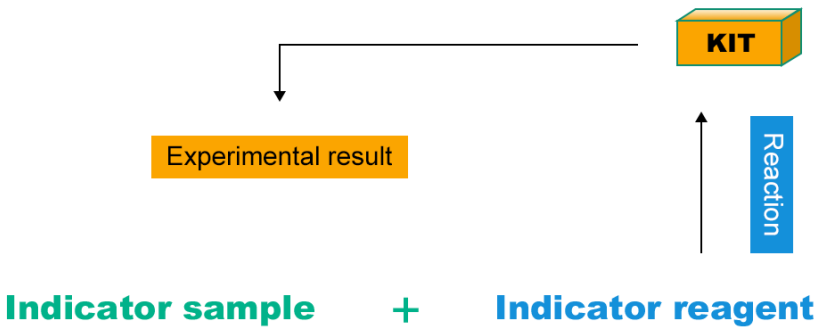
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0622 Size：50T/48S

超氧阴离子检测试剂盒说明书

可见分光光度法

***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、1 mL 玻璃比色皿、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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	氯仿	-	自备
亚硝酸钠标准品	液体 1mL×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0.31250.15625、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。

	空白管	测定管	标准管
标准溶液（mL）			0.2
样本（mL）		0.2	
提取液（mL）	0.5	0.3	0.3
试剂一(mL)	0.4	0.4	0.4
混匀，37℃水浴 20min			
试剂二（mL）	0.3	0.3	0.3
试剂三（mL）	0.3	0.3	0.3
混匀，37℃水浴 20min			
试剂四（mL）	0.5	0.5	0.5
混匀，8000rpm，25℃，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 A_{530}。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。			

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（μmol/mL）

（1）按照样本鲜重计算

超氧阴离子含量（μmol/g 鲜重）= 2x×V 样本÷（样本÷V 提取×W）=2x÷W。

超氧阴离子产生速率（μmol/ min/g 鲜重）= 2x×V 样本÷（V 样本÷V 提取×W）÷T =0.1x÷W。

（2）按照蛋白质浓度计算

超氧阴离子含量（μmol/min/mg prot）= 2x×V 样本÷（V 样本×Cpr）=2x÷Cpr。

超氧阴离子产生速率（μmol/ min/mg prot）=2x×V 样本÷（V 样本×Cpr）÷T=0.1x÷Cpr。

（3）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÷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。

七、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、样品制备好之后，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。