

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 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

产品内容：

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。			

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  $\text{NO}_2^-$ ， $\text{NO}_2^-$  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  $\text{O}_2^-$  含量。

自备实验用品及仪器：

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。

操作步骤：

### 一、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。

## 二、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 1.25 $\mu\text{mol/mL}$ ，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、0.0012 $\mu\text{mol/mL}$  梯度稀释的标准溶液，用 0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.0049、0.0012 $\mu\text{mol/mL}$  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 ( $\mu\text{L}$ )			40
样本 ( $\mu\text{L}$ )		40	
提取液 ( $\mu\text{L}$ )	100	60	60
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	80	80	80
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20min			
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	60	60	60
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	60	60	60
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20min			
试剂四 ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100
混匀，8000rpm，25 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 5min，小心吸取上层水相 200 $\mu\text{L}$ ，蒸馏水调零，微量玻璃比色皿/96 孔板，测定 530nm 处吸光值，计算 $\Delta A$ 标准=A 标准管-A 空白管， $\Delta A$ 样品=A 测定管-A 空白管。每次实验空白管仅需做一管。			

## 三、超氧阴离子含量计算公式

### 1. 标准曲线的绘制

以 $\Delta A$  标准为 y 轴，标准溶液浓度为 x 轴，绘制标准曲线  $y=kx+b$ 。

### 超氧阴离子含量的计算

将 $\Delta A$  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 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) = 2 x

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

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。

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。