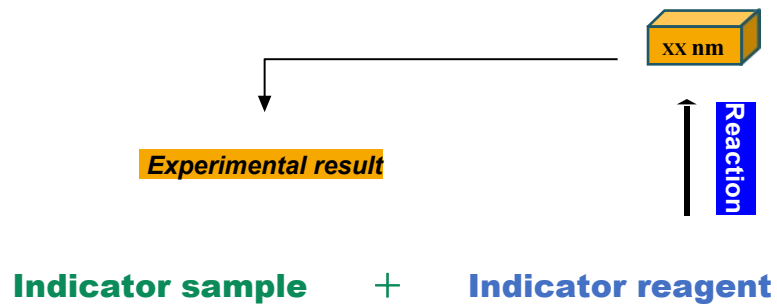


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

超氧阴离子(OFR)含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：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 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

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。

自备实验用品及仪器：

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。

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 $0.625\mu\text{mol/mL}$ ，然后进行倍比稀释至 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.0049、0.00244、0.0012、 $0.0006\mu\text{mol/mL}$ 梯度稀释的标准溶液，用 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.00244、 $0.0006\mu\text{mol/mL}$ 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°C 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°C 水浴 20min			
试剂四 (mL)	0.5	0.5	0.5
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 A_{530} 。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。			

三、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 $y=kx+b$ 。

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 ($\mu\text{mol/min/mg prot}$) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) = 2x \div C_{\text{pr}}$ 。

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

(3) 按照血清或培养液体积计算

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

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，0.2mL；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。

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。