

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

超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择 2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

超氧阴离子自由基作为生物体代谢过程中产生的一种自由基，可攻击生物大分子，如脂质、蛋白质、核酸和聚不饱和脂肪酸等，使其交链或者断裂，引起细胞结构和功能的破坏，与机体衰老和病变有很密切的关系，清除超氧阴离子自由基的研究已经得到了广泛的关注。

测定原理：

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)，与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- ， NO_2^- 与对氨基苯磺酸和 α -萘胺的作用生成红色的偶氮化合物，在530nm处有特征吸收峰，样品对超氧阴离子的清除能力与 530nm的吸光值呈负相关。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、低温离心机、可见分光光度计、1 mL玻璃比色皿、恒温水浴锅。

试剂组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 300ul×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加 30mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	-

样品处理

1. 组织：按照质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500万细胞加入 1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 培养液或其它液体：直接检测。
4. 粉剂药物可配制成相同浓度，比如 1mg/mL。

测定操作

注意：空白管只需测定一次。

	空白管	对照管	测定管
试剂一 (μL)	6	6	6
试剂二 (μL)		400	400
H ₂ O (μL)	500	100	
充分混匀, 25°C反应 1min			
样品 (μL)			100
试剂三 (μL)	200	200	200
充分混匀, 37°C反应 30min			
试剂四 (μL)	200	200	200
试剂五 (μL)	200	200	200
充分混匀, 37°C显色 20min, 于1mL玻璃比色皿, 以空白管调零, 在530nm处测定对照管和测定管的吸光值, 分别记为A对照管和A测定管。			

计算公式:

$$\text{超氧阴离子清除率 } 1\% = (\text{A对照管} - \text{A测定管}) \div \text{A对照管} \times 100\%$$

注意事项:

1. 试剂一4°C可保存2个月, 配制好的试剂二4°C可保存一周, 建议实验前配制, 并尽快使用。
2. 样品处理完后立即进行测定, 或者低温保存不超过24小时。