

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

微量法100T/96S

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：

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。

测定原理：

超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成NO₂⁻，NO₂⁻在对氨基苯磺酸和α-萘胺的作用下，生成红色的偶氮化合物，在530nm处有特征吸收峰，根据ΔA值可以计算样品中O₂⁻含量，反应式为NH₂OH + 2O₂⁻ + H⁺ → NO₂⁻ + H₂O₂ + H₂O。

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、微量石英比色皿/96孔板、氯仿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体110mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体15mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体15mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂四：氯仿，自备。

超氧阴离子提取

1. 植物、动物组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，然后，10000g，4℃，离心20min，取上清置于冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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10000g，4℃，离心20min，取上清置于冰上待测。
3. 血清或培养液：直接测定。

测定操作表

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至530nm。
2. 操作表

	空白管	测定管
样本（μL）		200
提取液（μL）	200	
试剂一(μL)	160	160
混匀，37℃水浴20min		

试剂二 (μL)	120	120
试剂三 (μL)	120	120
混匀, 37°C水浴20min		
试剂四 (μL)	200	200
混匀, 8000g, 25°C, 离心5min, 小心吸取上层水相200μL于微量石英比色皿/96孔板中, 测定A530。ΔA=A测定-A空白, 空白管只要做一管。		

超氧阴离子含量计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0242x - 0.0027$, $R^2 = 0.9980$

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/g} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \end{aligned}$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 细菌, 真菌:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/104 cell)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/104 cell} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 血清或培养液

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mL)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2$$

$$=148.76 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mL} \cdot \text{min)} = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div T$$

$$= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V样总：加入提取液体积，1 mL； V反总：反应总体积，0.36mL； V样：反应中样品体积，0.2mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量，g； T：反应时间，20min； 2：2分子O₂⁻参与反应生成1分子NO₂⁻。

b.用96孔板测定的计算公式如下

$$\text{标准曲线: } y = 0.0121x - 0.0027, R^2 = 0.9980$$

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2$$

$$= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/g} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \div T$$

$$= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 2$$

$$= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \div T$$

$$= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

2. 细菌, 真菌:

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/104 cell)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2$$

$$= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/104 cell} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T$$

$$= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量}$$

3. 血清或培养液

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mL)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2$$

$$= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mL} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div T$$

$$= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V样总：加入提取液体积，1 mL； V反总：反应总体积，0.36mL； V样：反应中样品体积，0.2mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量，g； T：反应时间，20min； 2：2分子O₂⁻参与反应生成1分子NO₂⁻。

注意事项

1. OD值大于1，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。

