

超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

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

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

AP-TEMED系统产生超氧阴离子，与盐酸羟胺反应生成NO₂⁻，NO₂⁻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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体1.5mL×1支，4°C避光保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4°C避光保存。临用前加6mL蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体7.5mL×1瓶，4°C保存。

试剂四：液体7.5mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂五：液体7.5mL×1瓶，4°C避光保存。

样品处理

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°C，10000g离心10min，取上清置于冰上待测。

细胞：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4°C，10000g离心10min，取上清置于冰上待测。

培养液或其它液体：直接检测。

粉剂药物可配制相同浓度，比如1mg/mL。

测定操作

	对照管	测定管
试剂一（μL）	10	10
试剂二（μL）	40	40
H ₂ O（μL）	25	

充分混匀，25°C反应1min		
样品 (μL)		25
试剂三 (μL)	50	50
充分混匀，37°C反应30min		
试剂四 (μL)	50	50
试剂五 (μL)	50	50
充分混匀，37°C显色20min，于微量石英比色皿/96孔板，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。		

注意：对照管只需测定一次。

计算公式

超氧阴离子清除率 I% =

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。