

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 NO_2^- ， NO_2^- 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 O_2^- 含量，反应式为 $\text{NH}_2\text{OH} + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。

试剂组成和配制：

| 产品名称 | OX021-50T/48S | Storage |
|--------|---------------|---------|
| 提取液：液体 | 100ml | 4°C |
| 试剂一：液体 | 25ml | 4°C |
| 试剂二：液体 | 20ml | 4°C避光 |
| 试剂三：液体 | 20ml | 4°C避光 |
| 试剂四：氯仿 | (自备) | -- |
| 说明书 | 一份 | |

自备仪器和用品：

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。

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°C，离心 20min，取上清置于冰上待测。。

2、细菌、真菌：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 10000g，4°C，离心 20min，取上清置于冰上待测。

3、血清或培养液：直接测定。

测定步骤：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

| | 空白管 | 测定管 |
|-------------------|-----|-----|
| 样本 (μl) | | 500 |
| 提取液 (μl) | 500 | |
| 试剂一 (μl) | 400 | 400 |
| 混匀, 37°C水浴 20min: | | |
| 试剂二 (μl) | 300 | 300 |
| 试剂三 (μl) | 300 | 300 |
| 混匀, 37°C水浴 20min | | |
| 试剂四 (μl) | 500 | 500 |

混匀, 8000g, 25°C, 离心 5min, 小心吸取上层水相 1ml, 1ml 玻璃比色皿, 蒸馏水调零, 测定 A530。
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$, 空白管只要做一管。

超氧阴离子含量计算公式:

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:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4 \text{ cell} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 血清或培养液

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

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

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 ml; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.9ml; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积, 0.5ml; C_{pr} : 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 O_2^- 参与反应生成 1 分子 NO_2^- 。

注意事项:



- 1、吸光值大于 2，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。

