

超氧阴离子(OFR)含量/超氧阴离子产生速率检测试剂盒说明书

(货号; ADS-W-YH012 微板法 96样)

有效期: 3个月

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 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 $\text{NH}_2\text{OH} + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。

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 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 8mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 6mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三: 液体 6mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂四: 氯仿, 自备。

超氧阴离子提取

- 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。
- 细菌、细胞: 按照细菌、细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌、细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细菌、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。
- 血清 (浆) 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

	对照管	测定管
样本 (μL)		40
提取液 (μL)	100	60
试剂一 (μL)	80	80
混匀, 37℃ 水浴 20min		
试剂二 (μL)	60	60
试剂三 (μL)	60	60
混匀, 37℃ 水浴 20min		
试剂四 (μL)	100	100
混匀, 8000g, 25℃, 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

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y=0.0115x-0.0038$, $R^2=0.9986$

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/g}) &= (\Delta A+0.0038) \div 0.0115 \div (W \div V_{\text{样总}}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}) &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div W \div T \\ &= 0.0087 \times (\Delta A+0.0038) \div W \end{aligned}$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A+0.0038) \div 0.0115 \div C_{\text{pr}} \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/mg prot} \cdot \text{min}) &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div C_{\text{pr}} \div T \\ &= 0.0087 \times (\Delta A+0.0038) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(3) 血清或培养液

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/ml}) &= (\Delta A+0.0038) \div 0.0115 \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}) &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div T \\ &= 0.0087 \times (\Delta A+0.0038) \end{aligned}$$

(4) 按照细菌、细胞个数计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/g}) &= (\Delta A+0.0038) \div 0.0115 \div (500 \div V_{\text{样总}}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div 500 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}) &= 0.174 \times (\Delta A+0.0038) \div 500 \div T \\ &= 0.0087 \times (\Delta A+0.0038) \div 500 \end{aligned}$$

V样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 10^{-3} : $1\mu\text{g/mL} = 10^{-3} \text{mg/mL}$; 500: 细胞或细菌总数, 500万; 2: 2 分子 O_2^- 参与反应生成 1 分子 NO_2^- 。

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=0.00575x-0.0038$, $R^2=0.9986$

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/g}) &= (\Delta A+0.0038) \div 0.00575 \div (W \div V_{\text{样总}}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.348 \times (\Delta A+0.0038) \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}) &= 0.348 \times (\Delta A+0.0038) \div W \div T \\ &= 0.0174 \times (\Delta A+0.0038) \div W \end{aligned}$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A+0.0038) \div 0.00575 \div C_{\text{pr}} \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.348 \times (\Delta A+0.0038) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/mg prot} \cdot \text{min}) &= 0.348 \times (\Delta A+0.0038) \div C_{\text{pr}} \div T \\ &= 0.0174 \times (\Delta A+0.0038) \div W \end{aligned}$$

(3) 血清或培养液

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/L}) &= (\Delta A + 0.0038) \div 0.00575 \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 0.348 \times (\Delta A + 0.0038) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}) &= 0.348 \times (\Delta A + 0.0038) \div T \\ &= 0.0174 \times (\Delta A + 0.0038) \end{aligned}$$

V样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 10^{-3} : $1\mu\text{g}/\text{mL} = 10^{-3} \text{mg}/\text{mL}$; 500: 细胞或细菌总数, 500万; 2: 2分子 O_2^- 参与反应生成1分子 NO_2^- 。

注意事项

OD值大于0.8, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数。

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。

试剂四有一定的毒性, 请操作时做好防护措施。