超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

（ 货号：ADS-F-KY019-48　分光法 48 样）

一、产品简介：

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，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。

在弱碱性条件下，邻苯三酚能发生自氧化反应产生超氧阴离子和有色中间产物，该中间产物在 320nm 处有特征吸收峰。当加入超氧阴离子清除剂时，它能迅速与超氧阴离子反应从而阻止中间产物的积累，使溶液在 320nm 处光吸收减弱。故可以通过测定 A320 值来评价清除剂对超氧阴离子的清除能力。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 65mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 支	4℃保存	临用前甩几下，使粉剂落到底部，每支再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂三	液体 2mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、离心机。

四、超氧阴离子清除能力的测定：

1、样本制备：

① 组织样本：称取 0.1g 样本（若是干样可取 0.02-0.05g），加入 1mL 的 80%乙醇（自备）进行匀浆，匀浆后转入 2mL 离心管中；于 50℃，200-300W 条件下超声提取 30min（间隔 5min 振荡混匀一次）。若有损耗需用 80%乙醇定容至 1mL，12000rpm 室温离心 10min，取上清待测。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 80%乙醇（自备）提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 室温离心 10min，取上清测定。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min，调波长至 320nm，试剂一和二于室温（25℃）预热 20min。

② 在 EP 管中依次加入下列试剂：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
试剂一	630	630	630
室温（25℃）孵育 20min			
样本	30	30	
蒸馏水		40	30
试剂二	40		40
室温（25℃）孵育 4min			
试剂三	20	20	20
混匀，于 320nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】：1.不同样本清除能力不一，**可先选取** 2 个样本做检测，若 A 空白大于 1.5 可缩短反应时间（如由 5min 减至 2min）；

2.若 A 测定减 A 对照的差值大于空白管，需增加样本加样量（如由 30μL 增至 60μL，则试剂一相应减少）；若 A 测定减 A 对照的差值小于 0.1，需对样本用 80%乙醇稀释后再检测。

五、结果计算：

超氧阴离子清除率 I%=[1-(A 测定-A 对照)÷A 空白]×100%