

超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY019-96 微板法 96 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 45mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 2 支	4°C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°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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°C, 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 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 320nm,试剂一和二需于室温(25°C)预热 20min。

② 在 96 孔板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	200	200	200
室温(25°C)孵育 20min			
样本	10	10	
蒸馏水		20	10
试剂二	20		20
室温(25°C)孵育 5min			
试剂三	10	10	10
混匀,3min 后于 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 10 μ L 增至 40 μ L，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 $I\% = [1 - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div A \text{ 空白}] \times 100\%$