

超氧阴离子(OFR)含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC1290

规格: 50T/48S

产品内容:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 32mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 25mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三: 液体 25mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂四: 氯仿, 自备。

亚硝酸钠标准品: 液体 1mL×1 支, 4℃ 保存。10μmol/mL 亚硝酸钠。

产品说明:

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。

超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酰胺和萘乙二胺盐酸盐的作用下, 生成红色的偶氮化合物, 在 530nm 有特征吸收峰, 根据 A_{530} 值可以计算样品中 O_2^- 含量。

自备实验用品及仪器:

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。

操作步骤:

一、超氧阴离子提取

1. 植物、动物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入提取液 1mL, 充分研磨, 12000rpm, 4℃, 离心 20min, 取 20μL 上清测定蛋白含量, 其余上清作为待测样本。

2. 标准溶液的制备

取适量亚硝酸钠标准液, 首先 16 倍稀释至 0.625μmol/mL, 然后进行倍比稀释至 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.0049、0.00244、0.0012、0.0006μmol/mL 梯度稀释的标准溶液, 用 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.009765、0.00244、0.0006μmol/mL 标准管做标准曲线。

3. 血清或培养液: 直接测定。

二、测定操作表

	对照管	测定管	标准管
标准溶液			0.2
样本 (mL)		0.2	
提取液 (mL)	0.5	0.3	0.3
试剂一(mL)	0.4	0.4	0.4
混匀, 37℃水浴 20min			

试剂二 (mL)	0.3	0.3	0.3
试剂三 (mL)	0.3	0.3	0.3
混匀, 37℃水浴 20min			
试剂四 (mL)	0.5	0.5	0.5
混匀, 8000rpm, 25℃, 离心 5min, 小心吸取上层水相 1mL, 蒸馏水调零, 1mL 比色皿, 测定 A_{530} 。计算 ΔA 标准=A 标准管-A 对照管, ΔA 样品=A 测定管-A 对照管。每次实验对照管仅需做一管。			

三、超氧阴离子含量计算公式

1.标准曲线的绘制

以 ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。

2.超氧阴离子含量的计算

将 ΔA 样品带入方程得到 x 值 ($\mu\text{mol/mL}$)

(1) 按照样本质量计算

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) = x \div W$ 。

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 0.05x \div W$ 。

(2) 按照蛋白质浓度计算

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$ 。

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/mg prot} \cdot \text{min}$) = $x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.05x \div C_{\text{pr}}$ 。

(3) 血清或培养液

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = x

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$) = $x \div T = 0.05x$ 。

V 样本: 参与反应样本体积, 0.2ml; V 提取: 提取过程中加入的提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min。

注意事项:

- 1、OD 值大于 1.0, 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。