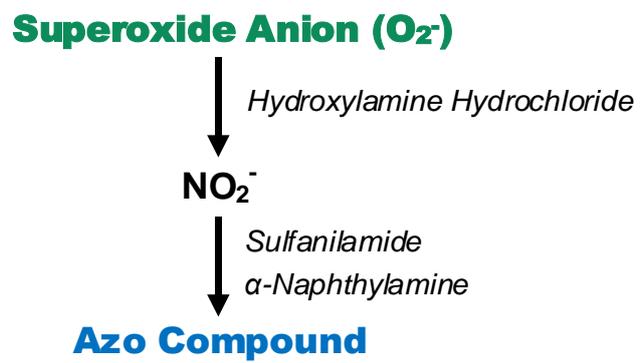




超氧阴离子含量检测试剂盒
Superoxide Anion Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



超氧阴离子含量检测试剂盒

Superoxide Anion Content Assay Kit

一、产品描述

超氧阴离子 (O_2^-) 在生物反应过程中起着重要作用, 具有免疫和信号传导的功能。超氧阴离子与生物体的衰老和病变密切相关, 因其具有很强的氧化性和还原性, 当积累过多超出生物体抗氧化防御能力时, 会对细胞膜及生物大分子的结构和功能造成损伤, 导致机体细胞和组织代谢异常。

超氧阴离子能够氧化盐酸羟胺生成 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺的作用下, 生成红色偶氮化合物, 产物在 530 nm 处具有特征吸收峰, 根据吸光值变化即可定量检测 O_2^- 的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	10 μ mol/mL 亚硝酸钠标准液
标准稀释液的制备: 将 10 μ mol/mL 亚硝酸钠标准液使用蒸馏水稀释至 0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 μ mol/mL 即为标准稀释液。			

需自备试剂: 氯仿 ($CHCl_3$, MW=119.39, CAS: 67-66-3)

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (μ mol/mL)	10	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	0.05
标准液体积 (μ L)	100	200	150	100	50	200	200
蒸馏水体积 (μ L)	900	300	350	400	450	200	200
稀释后浓度 (μ mol/mL)	1.0	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、氯仿和蒸馏水。

1.超氧阴离子的提取（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）=1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 10000 g 离心 20 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管中，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min）；4℃ 10000 g 离心 20 min，取上清置于冰上待测。

③血清、培养液等液体样本：直接测定或使用提取液适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 530 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
待测样本	40	-	-
标准稀释液	-	40	-
提取液	60	60	100
试剂一	80	80	80
充分混匀，37℃反应 20 min			
试剂二	60	60	60
试剂三	60	60	60
充分混匀，37℃反应 20 min			
氯仿	100	100	100
充分混匀，8000 g 常温离心 5 min			

吸光值测定：吸取 200 μL 上层水相至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 530 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标（x），对应的 ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

3.超氧阴离子含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{2 \times x \times V_{\text{样总}}}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}} = \frac{2 \times x}{C_{\text{pr}}}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/min/mg prot}) = \frac{2 \times x \times V_{\text{样总}}}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}} \times T} = \frac{0.1 \times x}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{2 \times x \times V_{\text{样总}}}{W} = \frac{2 \times x}{W}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/min/g}) = \frac{2 \times x \times V_{\text{样总}}}{W \times T} = \frac{0.1 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{2 \times x \times V_{\text{样总}}}{\text{细菌或细胞数量}} = \frac{2 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) = \frac{2 \times x \times V_{\text{样总}}}{\text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{0.1 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/mL}) = 2 \times x$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/min/mL}) = \frac{2 \times x}{T} = 0.1 \times x$$

注释： V 样总：待测样本总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，20 min；2：换算系数，2 分子 O₂⁻反应生成 1 分子 NO₂⁻。

四、注意事项

①若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本使用提取液适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

②样本提取后应立即测定，请勿将待测样本长时间低温保存，以免影响测定结果；

③氯仿具有一定毒性，建议在通风橱中进行操作，并做好相应防护措施；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

