

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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 A_{530} 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

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

	空白管	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，8000rpm，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，空白管调零，测定 530nm 处吸光值，记为 A_{530} 。		

超氧阴离子含量计算公式

a. 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. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/g}) &= (A_{530}+0.0038) \div 0.0115 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 1.74 \times (A_{530}+0.0038) \div W\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}) &= 1.74 \times (A_{530}+0.0038) \div W \div T \\ &= 0.087 \times (A_{530}+0.0038) \div W\end{aligned}$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (A_{530}+0.0038) \div 0.0115 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 1.74 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/mg prot}\cdot\text{min}) &= 1.74 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{Cpr} \div T \\ &= 0.087 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 细菌, 真菌:

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (A_{530}+0.0038) \div 0.0115 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 1.74 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/mg prot min}) &= 1.74 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 0.087 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

3. 血清或培养液

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/L}) = (A_{530}+0.0038) \div 0.0115 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 = 1739.13 \times (A_{530}+0.0038)$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}) = 1739.13 \times (A_{530}+0.0038) \div T = 86.96 \times (A_{530}+0.0038)$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 反总: 反应总体积, 0.4mL; V 样: 反应中样品体积, 0.04mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 2: 2 分子 O₂⁻ 参与反应生成 1 分子 NO₂⁻。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/g}) &= (A_{530}+0.0038) \div 0.00575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 3.48 \times (A_{530}+0.0038) \div W\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}) &= 3.48 \times (A_{530}+0.0038) \div W \div T \\ &= 0.174 \times (A_{530}+0.0038) \div W\end{aligned}$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (A_{530}+0.0038) \div 0.00575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 3.48 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol/mg prot}\cdot\text{min}) &= 3.48 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{Cpr} \div T \\ &= 0.174 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 细菌, 真菌:

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (A_{530}+0.0038) \div 0.00575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10^{-3} \times 2 \\ &= 3.48 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}\cdot\text{min}) &= 3.48 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 0.174 \times (A_{530}+0.0038) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

3. 血清或培养液

超氧阴离子含量($\mu\text{mol/L}$) = $(A_{530}+0.0038) \div 0.00575 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 = 3478.26 \times (A_{530}+0.0038)$

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) = $3478.26 \times (A_{530}+0.0038) \div T = 173.91 \times (A_{530}+0.0038)$

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.4mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积, 0.04mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量, g; T : 反应时间, 20min; 2: 2 分子 O_2^- 参与反应生成 1 分子 NO_2^- 。

注意事项

- 1、OD 值大于 1.5, 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。
- 4、最低检出限为 $0.33\mu\text{mol/L}$ 。