

Superoxide Anion Assay Kit

超氧阴离子含量测定试剂盒 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL880A	超氧阴离子含量测定试剂盒 分光法	48T

产品简介:

氧分子作为生物体内最重要的电子受体在物质代谢过程中被还原: $O_2+4e^- \rightarrow 2O^{2-}$,其中约5%的氧在还原过程中由于接受电子数目不等可以形成多种性质活泼的活性氧。氧分子受单一电子还原的产物称为超氧阴离子 $O_2+e^- \rightarrow O_2^-$ 。 O_2^- 是阴离子,又是自由基,性质活泼,具有很强的氧化性和还原性,既是氧化剂,又是还原剂。

超氧阴离子等活性氧在生物体内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。因此在逆境条件下生物体内超氧阴离子自由基的产生,可间接反映组织细胞受损状况和抗性强弱。

超氧阴离子(O_2^-)与羟胺反应产生 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺作用下,生成粉红色的偶氮染料,该染料在540nm处有最大光吸收,根据A540值可计算出样品中的 O_2^- 的含量。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	60mL×1瓶	4°C保存	
试剂一	10mL×1瓶	4°C保存	
试剂二	10mL×1瓶	4°C保存	使用前,根据样本数量,将试剂二、三等比例混合成无色的反应mix(若变粉色,则不能使用)。两天内用完。
试剂三	10mL×1瓶	4°C保存	
标准品	粉末×1支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂

使用方法:

建议正式实验前,选取2个样本做预测定,了解实验样品情况,熟悉流程,避免样本和试剂浪费!

一、样本准备

1. 组织样本:

- 称取约0.1g组织(水分充足的样本可取0.5g),加入1mL提取液,冰浴匀浆;
- 12000rpm,4°C离心10min,取上清液,置冰上待测。

【注】:①可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取。

②提取液尽快测定,请勿将样品进行长时间的低温保存,以免影响测定结果。

2. 细菌/细胞样本:

- 收集细菌或细胞到离心管内,离心弃上清;
- 取 5×10^6 个细菌或细胞加入1mL提取液,冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴,强度20%或200W,超声3S,间隔10S,重复30次);
- 12000rpm,4°C离心10min,取上清液,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入1mL提取液进行提取。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。



3. 液体样品:

澄清的液体可直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

二、样品测定

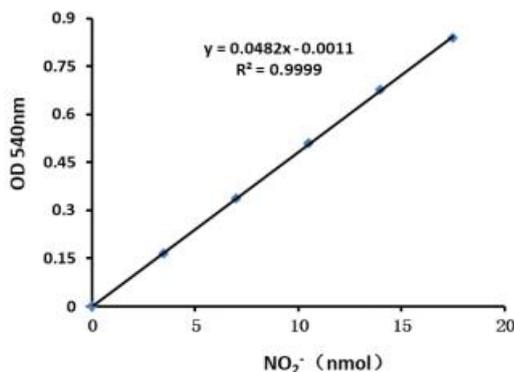
1. 可见分光光度计预热 30min, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 在离心管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	175	-
提取液	-	175
试剂一	175	175
混匀, 37°C反应 10min		
反应 mix	350	350
混匀, 37°C反应 5min (准确时间), 立即取全部液体于 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中 (若浑浊可 8000rpm 室温离心 5min 后取上清), 立即于 540nm 处检测, 分别记为 A 测定管和 A 空白管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

- 【注】:**
1. 若测定管的 A 值超过 0.7, 则需减少上清液加样量 (如降低为 50μL, 另用蒸馏水补齐), 改变后的 V1 带入公式计算。
 2. 若 ΔA 差值低于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由原 175μL 增至 300μL, 则试剂一减至 50μL), 或增加样本取样质量 W, 则改变后的 V1 和 W 需带入公式重新计算。
 3. 若样本背景值较深 (如粉红色或深红色), 可加做一个样本自身对照管即: 175μL 样本+175μL 蒸馏水, 混匀, 37°C (可用恒温培养箱) 反应 10min, 再加 350μL 反应 mix, 混匀, 37°C 反应 5min (准确时间), 立即于 540nm 处检测 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。
 4. 最后一步上机检测, 需要立即检测 (须在 15min 之内完成测定), 否则随着时间的推移, 吸光值会有所下降。

三、含量计算

1. 标准曲线方程: $y = 0.0482x - 0.0011$, x 是 NO_2^- 的摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2. 按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div (V1 \div V \times W) \times 2 \times D \\ &= 237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

3. 按细菌/细胞计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div (V1 \div V \times 500) \times 2 \times D \\ &= 237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算:

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div V1 \times 2 \times D$$

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



$$=237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \times D$$

V---提取液的体积, 1mL

W---样品鲜重, g

2---生成 1 个 NO₂⁻需要 2 个 O₂⁻

500---细菌/细胞数量, 万

V1---加入反应体系的样品量, 0.175mL

D---稀释倍数, 未稀释即为 1

标准品亚硝酸钠的分子量---69

附: 标准曲线制作过程:

1. 制备标准品母液(100μmol/mL): 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20°C 保存)。
2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。

注意事项:

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

4°C保存六个月。

