

## 超氧阴离子(Superoxide anion, OFR)试剂盒

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<sub>2</sub><sup>-</sup>，NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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 ΔA 值可以计算样品中 O<sub>2</sub><sup>-</sup>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 110mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 15mL×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<sup>4</sup> 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。

#### 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 = 0.0242x - 0.0027，R<sup>2</sup>=0.9980

#### 1. 组织：

（1）按照样本质量计算

超氧阴离子含量（nmol/g 鲜重）= (ΔA+0.0027)÷0.0242×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)×2

=148.76×(ΔA+0.0027)÷W

超氧阴离子产生速率（nmol/g • min）=148.76×(ΔA+0.0027)÷W÷T=7.44×(ΔA+0.0027)÷W

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 2 = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr} \div T = 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}$$

2. 细菌, 真菌:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/104 cell)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/104 cell} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 血清或培养液

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mL)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mL} \cdot \text{min)} = 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div T = 7.44 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 0.36mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样品体积, 0.2mL;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样品质量, g;  $T$ : 反应时间, 20min;  $2 \cdot 2$  分子  $\text{O}_2^-$  参与反应生成 1 分子  $\text{NO}_2^-$ 。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线:  $y = 0.0121x - 0.0027$ ,  $R^2 = 0.9980$

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2$$

$$=297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/g} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \div T = 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 2 = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \\ &\div \text{Cpr} \end{aligned}$$
$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr} \div T = 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}$$

## 2. 细菌，真菌：

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2$$

$$= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4 \text{ cell} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T$$

$$= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量}$$

## 3. 血清或培养液

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mL)} = (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mL} \cdot \text{min)} = 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div T = 14.88 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.36 mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样品体积，0.2 mL； $\text{Cpr}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样品质量，g； $T$ ：反应时间，20 min；2：2 分子  $\text{O}_2$  参与反应生成 1 分子  $\text{NO}_2^-$ 。

## 注意事项

- 1、OD 值大于 1，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。