

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

(货号: G0116F 分光法 48 样)

一、产品简介:

当生物体遭受外界胁迫时,生物体内超氧阴离子等活性氧大量产生和积累,可作为生物体氧化胁迫的信号。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 A_{540} 值可计算出样品中的 O_2^- 的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	临用前,可依据待检测样本数量,把试剂二和试剂三等比例混合成无色的反应 mix (注意观察,若变粉色,则不能使用)。两天之内用完。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、天平、水浴锅、离心机、研钵、可调式移液器、冰、蒸馏水。

四、超氧阴离子(OFR)测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

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,然后 4℃×12000rpm,离心 10min,取上清作为粗体液,置于冰上待测。

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

b、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:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm,4℃,离心 10min,取上清液测定。

【注】: 若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测

① 可见分光光度计预热 30min,调节波长至 540nm,蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

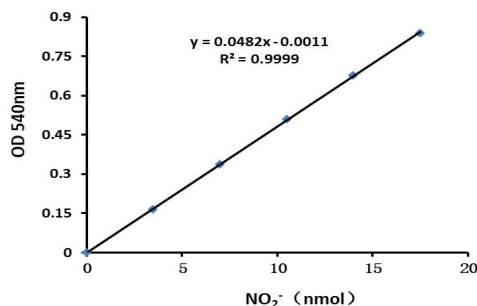
试剂名称(μ L)	测定管	空白管(只做一次)
样本	175	
提取液		175
试剂一	175	175
混匀, 37℃反应 10min		

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(若浑浊可于 8000rpm 室温下离心 5min 后取全部上清液), 立即于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-A 空白。		

- 【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 50 μ L, 另用蒸馏水补充)。则改变后的 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 175 μ L 增至 300 μ L, 则试剂一减至 50 μ L), 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: 175 μ L 样本+175 μ L 蒸馏水, 混匀, 37°C(可用恒温培养箱)反应 10min, 再加 350 μ L 反应 mix, 混匀, 37°C 反应 5min(准确时间), 立即于 540nm 处检测, $\Delta A = A$ 测定管-A 对照管。
- 4.最后一步上机检测, 需要立即检测(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。

五、结果计算:

- 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:

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div V1 \times 2 \times D = 237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \times D$$

V---提取液的体积, 1mL;

W---样品鲜重, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

标准品亚硝酸钠的分子量---69。

V1---加入反应体系的样品量, 0.175mL;

500---细胞数量, 万;

2---生成 1 个 NO_2^- 需要 2 个 O_2^- ;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (100 μ mol/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. μ mol/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。