

超氧阴离子含量检测试剂盒说明书

Superoxide Anion Assay Kit

分光光度法

货号：AK294

规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液 ES41	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK294-A	30mL×1 瓶	4℃保存；
AK294-B	25mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK294-C	25mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK294-D	氯仿，自备	室温保存；
AK294-标准品 (10μmol/mL)	1mL×1 瓶	4℃保存。

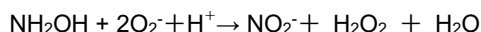
※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：超氧阴离子（superoxide anion, O_2^- ）是一种通过向氧中添加电子而产生的短命自由基，它是由紫外光、香烟烟雾、环境污染物和 γ 射线等环境因素，或是由红色素氧化酶或 NADPH 氧化酶等氧化酶形成的。 O_2^- 一旦形成，就会攻击细胞成分，对脂质、蛋白质和 DNA 造成损害。这会引发许多疾病，包括癌症、动脉粥样硬化、类风湿关节炎、糖尿病、肝损伤和中枢神经系统疾病。

超氧阴离子在免疫系统中起着关键作用，保护动物免受感染。高活性氧阴离子由受刺激的白细胞释放，包括单核细胞、巨噬细胞和多形核白细胞。在免疫细胞中，超氧化物阴离子是由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酶（NADPH）氧化酶产生的。

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 A530 值可以计算样品中 O_2^- 含量，反应式为：



自备用品：

可见分光光度计、研钵/匀浆器、台式离心机、天平、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、氯仿和蒸馏水。

超氧阴离子提取：

1. 植物、动物组织：

植物、动物组织：按照组织质量 (g)：提取液 ES41 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 ES41）进行冰浴匀浆，然后，10000g，4℃，离心 20min，取上清置于冰上待测。

2. 血清或培养液：直接测定。

测定步骤

1. 分光光度计预热 30min，调节波长至 530nm，蒸馏水调零；
2. AK294-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min；
3. 标准品的制备：用蒸馏水将标准品稀释为 0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125、0.0039μmol/mL 的标准溶液待用；
4. 在 EP 中按顺序加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)	标准管(μL)
样本		200	
标准品			200
提取液 ES41	500	300	300
AK294-A	400	400	400
混匀, 37°C水浴 20min			
AK294-B	300	300	300
AK294-C	300	300	300
混匀, 37°C水浴 20min			
AK294-D	500	500	500
混匀, 8000rpm, 25°C, 离心 5min, 小心吸取上层水相 1mL, 测定 A530; 计算ΔA 标准=A 标准管-A 空白管, ΔA 样本=A 测定管-A 空白管。(空白管只需做 1-2 次。)			

超氧阴离子含量计算公式:

标准曲线的绘制: 以ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

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

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

(2) 按照蛋白质浓度计算

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

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

2. 血清或培养液:

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

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

注: V 提取: 加入提取液体积, 1 mL; V 样本: 反应中样品体积, 0.2mL; 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⁻。

注意事项:

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定, 并注意计算公式里乘以相应倍数。
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. AK294-D(氯仿) 有一定的毒性, 操作时请做好防护措施。
4. 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)。