

## 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  $\text{NO}_2^-$ ， $\text{NO}_2^-$  在对氨基苯磺酸和  $\alpha$ -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  $\Delta A$  值可以计算样品中  $\text{O}_2^-$  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 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 ( $10^4$  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：

分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 530nm。

#### 1、操作表

	空白管	测定管
样本 (μL)		200
提取液 (μL)	200	
试剂一(μL)	160	160
混匀，37℃水浴 20min		
试剂二 (μL)	120	120

试剂三 (μL)	120	120
混匀, 37℃水浴 20min		
试剂四 (μL)	200	200
混匀, 8000g, 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, 测定 A530。Δ A=A-测定-A 空白, 空白管只要做一管。		

### 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:  $y = 0.0242x - 0.0027$ ,  $R^2 = 0.9980$

##### 1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

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

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

(2) 按照蛋白质浓度计算

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

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

##### 2. 细菌, 真菌:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0242 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4 \text{ cell} \cdot \text{min)} &= 148.76 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 7.44 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

##### 3. 血清或培养液

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

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

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 反总: 反应总体积, 0.36mL; V 样: 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 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 参与反应生成 1 分子 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>。

#### 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

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \\ &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \end{aligned}$$

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

(2) 按照蛋白质浓度计算

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times 2 \\ &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \div T \\ &= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 细菌，真菌：

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0027) \div 0.0121 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 \\ &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4 \text{ cell} \cdot \text{min)} &= 297.52 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \div T \\ &= 14.88 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 血清或培养液

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

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

V 样总：加入提取液体积，1 mL； V 反总：反应总体积，0.36mL； V 样：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 O<sub>2</sub><sup>-</sup>参与反应生成 1 分子 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>。

**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。