

## 超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

**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、1 mL 玻璃比色皿、氯仿和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 20mL×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：

	空白管	测定管
样本 (μL)		500
提取液 (μL)	500	
试剂一 (μL)	400	400
混匀，37℃ 水浴 20min		
试剂二 (μL)	300	300

试剂三 (μL)	300	300
混匀, 37℃水浴 20min		
试剂四 (μL)	500	500
混匀, 8000g, 25℃, 离心 5min, 小心吸取上层水相 1mL, 1mL 玻璃比色皿, 蒸馏水调零, 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:**

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, 0.9mL; V 样: 反应中样品体积, 0.5mL; 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、吸光值大于 2, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数。
- 2、样品制备好之后, 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。