

超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

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：

超氧阴离子自由基作为生物体代谢过程中产生的一种自由基，可攻击生物大分子，如脂质、蛋白质、核酸和聚不饱和脂肪酸等，使其交链或者断裂，引起细胞结构和功能的破坏，与机体衰老和病变有很密切的关系，清除超氧阴离子自由基的研究已经得到了广泛的关注。

测定原理：

AP-TEMED 系统产生超氧阴离子，与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- ， NO_2^- 与对氨基苯磺酸和 α -萘胺的作用生成红色的偶氮化合物，在 530nm 处有特征吸收峰，样品对超氧阴离子的清除能力与 530nm 的吸光值呈负相关。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 1.5mL×1 支，4℃ 避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 6mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体 7.5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 7.5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂五：液体 7.5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

样品处理

1. 组织：按照质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：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 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 培养液或其它液体：直接检测。
4. 粉剂药物可配制成相同浓度，比如 1mg/mL。

测定操作

	对照管	测定管
试剂一 (μL)	10	10
试剂二 (μL)	40	40
H ₂ O (μL)	25	

充分混匀，25℃反应 1min		
样品 (μL)		25
试剂三 (μL)	50	50
充分混匀，37℃反应 30min		
试剂四 (μL)	50	50
试剂五 (μL)	50	50
充分混匀，37℃显色 20min，于微量石英比色皿/96 孔板，在 530nm 处测定对照管和测定管的吸光值，分别记为 A 对照管和 A 测定管。		

注意：对照管只需测定一次。

计算公式：

$$\text{超氧阴离子清除率 \%} = \frac{\text{A对照管} - \text{A测定管}}{\text{A对照管}} \times 100\%$$

注意事项：

1. 试剂一 4℃可保存 2 个月，配制好的试剂二 4℃可保存一周，建议实验前配制，并尽快使用。
2. 样品处理完后立即进行测定，或者低温保存不超过 24 小时。