

超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-F-KY019 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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, 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。

外源体系产生的氧自由基与还原型物质作用生成紫红色的化合物, 在 570nm 处有特征吸收峰, 样品对超氧阴离子的清除能力与 570nm 的吸光值呈负相关。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 55mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	粉剂 A×5 支 液体 B×1 支	4°C 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.1mL 液体 B 振荡或超声溶解后, 再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用即加样表中的试剂二 (务必加 0.1mL 液体 B 溶解后再加水), 一周内用完。
试剂三	液体 2 支	4°C 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解, -20°C 保存。
试剂四	粉剂 1 瓶	4°C 避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7 mL 蒸馏水充分溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取 0.1g 样本 (若是干样可取 0.02-0.05g), 加入 1mL 的 80%乙醇 (自备) 进行匀浆, 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 50°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次)。若有损耗需用 80%乙醇定容至 1mL, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清待测。
- 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 的 80%乙醇 (自备), 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- ③ 液体: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤：

① 可见分光光度计预热 30min（等仪器过自检程序亦可）并调至 570nm，蒸馏水调零，所有试剂至室温（25℃）。

② 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入下列试剂：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	40	40	
试剂一	500	540	540
试剂二	160	160	160
试剂三	40		40
试剂四	60	60	60
混匀，于 37℃ 反应 10min，于 570nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】：不同样本清除能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 测定或 A 对照值大于 A 空白；可增加样本量（如由 40μL 增至 80μL，则试剂一相应减少）。若 A 测定-A 对照接近零，需对样本进行稀释（用 80%乙醇稀释）后再检测。

五、结果计算：

超氧阴离子清除率 $I\% = [1 - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div A \text{ 空白}] \times 100\%$