

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-YH008 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

当生物体遭受外界胁迫时, 生物体内超氧阴离子等活性氧大量产生和积累, 可作为生物体氧化胁迫的信号。因此在逆境条件下生物体内超氧阴离子自由基的产生, 可间接反映组织细胞受损状况和抗性强弱。超氧阴离子 (O_2^-) 与羟胺反应产生 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺作用下, 生成粉红色的偶氮染料, 该染料在 540nm 处有最大光吸收, 根据 A_{540} 值可计算出样品中的 O_2^- 的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前, 可依据待检测样本数量, 把试剂二和试剂三等比例混合成无色的反应 mix (注意观察, 若变粉色, 则不能使用)。两天之内用完。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 然后 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清作为粗体液, 置于冰上待测。

【注】: a、可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

b、提取液尽快测定, 请勿将样品进行长时间的低温保存, 以免影响测定结果。

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 提取液, 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, 取上清液测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 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), 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	175	

提取液		175
试剂一	175	175
混匀，37℃反应 10min		
反应 mix	350	350
混匀，37℃反应 5min（准确时间），立即取全部液体于 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中（若浑浊可于 8000rpm 室温下离心 5min 后取全部上清液），立即于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：1.若测定管的 A 值超过 0.7，则需减少上清液加样量（如降低为 50μL，另用蒸馏水补充）。则改变后的 V1 带入公式计算。

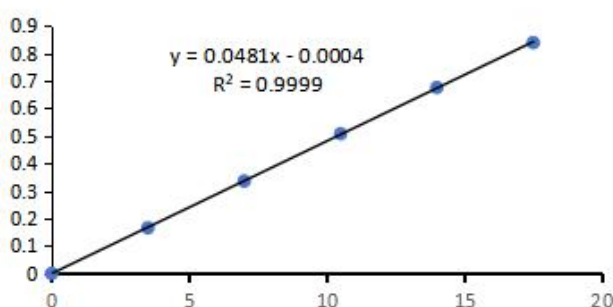
2.若 ΔA 差值低于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由原 175μL 增至 300μL，则试剂一减至 50μL），或增加样本取样质量 W，则改变后的 V1 和 W 需带入公式重新计算。

3.若样本背景值较深（如粉红色或深红色），可加做一个样本自身对照管即：175μL 样本+175μL 蒸馏水，混匀，37℃（可用恒温培养箱）反应 10min，再加 350μL 反应 mix，混匀，37℃反应 5min（准确时间），立即于 540nm 处检测， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

4.最后一步检测步骤，需要立即检测（在 15min 之内完成测定），否则随着时间的推移，吸光值会有所下降。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0481x - 0.0004$ ，x 是 NO_2^- 的摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0481] \div (V1 \div V \times W) \times 2 \times D \\ = 237.6 \times (\Delta A + 0.0004) \div W \times D$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mg Prot)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0481] \div (V1 \div V \times Cpr) \times 2 \times D \\ = 237.6 \times (\Delta A + 0.0004) \div Cpr \times D$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0481] \div V1 \times 2 \times D = 237.6 \times (\Delta A + 0.0004) \times D$$

5、按细菌/细胞计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0481] \div (V1 \div V \times 500) \times 2 \times D \\ = 0.475 \times (\Delta A + 0.0004) \times D$$

V---提取液的体积，1mL；

V1---加入反应体系的样品量,0.175mL；

W---样品鲜重，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1； 2---生成 1 个 NO_2^- 需要 2 个 O_2^- ；
标准品亚硝酸钠的分子量---69。
Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 制备标准品母液（100 $\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。（母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存）
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 50 μL ，加入 49.9ml 蒸馏水，混匀得到 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	175	
蒸馏水		175
试剂一	175	175
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ （可用恒温培养箱）反应 10min		
反应 mix	350	350
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5min（准确时间），立即取全部液体于 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中（若浑浊可于 8000rpm 室温下离心 5min 后取全部上清液），立即于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		

1