

超氧阴离子清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY019-96 微板法 96 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。

在弱碱性条件下, 邻苯三酚能发生自氧化反应产生超氧阴离子和有色中间产物, 该中间产物在 320nm 处有特征吸收峰。当加入超氧阴离子清除剂时, 它能迅速与超氧阴离子反应从而阻止中间产物的积累, 使溶液在 320nm 处光吸收减弱。故可以通过测定 A320 值来评价清除剂对超氧阴离子的清除能力。

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 45mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 支	4℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解。 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 2mL×1 支	4℃避光保存	

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)、96 孔板 (UV 板)、离心管、酶标仪、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℃, 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 80%乙醇 (自备) 提取液, 于 50℃, 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。

【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: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 320nm, 试剂一和二需于室温 (25℃) 预热 20min。

② 在 96 孔板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)
试剂一	200	200	200
室温 (25°C) 孵育 20min			
样本	10	10	
蒸馏水		20	10
试剂二	20		20
室温 (25°C) 孵育 5min			
试剂三	10	10	10
混匀, 3min 后于 320nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】：1.不同样本清除能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 空白大于 1.5 可缩短反应时间（如由 5min 减至 2min）；

2.若 A 测定减 A 对照的差值大于空白管，需增加样本加样量（如由 10μL 增至 40μL，则试剂一相应减少）；若 A 测定减 A 对照的差值小于 0.1，需对样本用 80%乙醇稀释后再检测。

五、结果计算：

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