

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 14mL×1 瓶	4°C保存	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 12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、天平、水浴锅、离心机、研钵、可调式移液器、冰、蒸馏水。

四、超氧阴离子(OFR)测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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12000rpm,4°C,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,离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热30min,调节波长至540nm。

② 在EP管中依次加入:

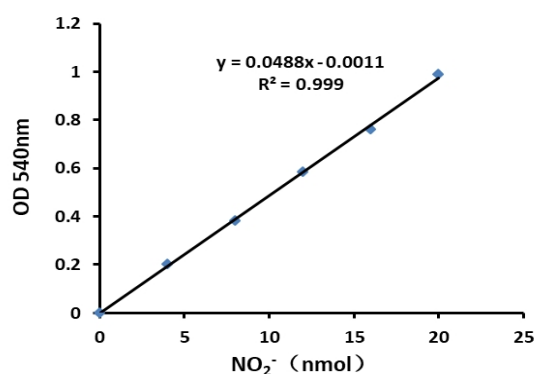
试剂名称(μ L)	测定管	空白管(只做一次)
样本	100	
提取液		100
试剂一	100	100
混匀,37°C(可用恒温培养箱)反应10min		

反应 mix	200	200
混匀，37°C反应 5min（准确时间），立即取出 200μL 至 96 孔板中（若浑浊可于 8000rpm 室温下离心 5min 后取 200μL 上清液），于 540nm 处检测读取吸光度 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

- 【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 30μL，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 100μL 增至 180μL，则试剂一减至 20μL，试剂一最少量为 10μL），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：100μL 样本+100μL 蒸馏水，混匀，37°C（可用恒温培养箱）反应 10min，再加 200μL 反应 mix，混匀，37°C反应 5min（准确时间），立即于 540nm 处检测， $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。
- 4.最后一步上机检测，需要立即检测（须在 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： $y = 0.0488x - 0.0011$ ，x 是 NO_2^- 的摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



- 2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0488] \div (V1 \div V \times W) \times 2 \times D \\ &= 410 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按细菌/细胞计算：

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0488] \div (V1 \div V \times 500) \times 2 \times D \\ &= 410 \times (\Delta A + 0.0011) \div 500 \times D \end{aligned}$$

- 4、按照液体体积计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0488] \div V1 \times 2 \times D = 410 \times (\Delta A + 0.0011) \times D$$

V---提取液的体积，1mL；

V1---加入反应体系的样品量，0.1mL；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（100μmol/mL）：标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。（母液需在两天内用且-20°C保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2. μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。
