

超氧阴离子含量检测试剂盒说明书

Superoxide Anion Assay Kit

微量法

货号: AK295

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES41	110mL×1 瓶	4℃保存;
AK295-A	12mL×1 瓶	4℃保存;
AK295-B	8mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK295-C	8mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK295-D	氯仿, 自备	室温保存;
AK295-标准品 (10μmol/mL)	0.5mL×1 瓶	4℃保存。

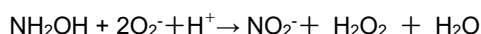
※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 超氧阴离子 (superoxide anion, O_2^-) 是一种通过向氧中添加电子而产生的短命自由基, 它是由紫外光、香烟烟雾、环境污染物和 γ 射线等环境因素, 或是由红色素氧化酶或 NADPH 氧化酶等氧化酶形成的。 O_2^- 一旦形成, 就会攻击细胞成分, 对脂质、蛋白质和 DNA 造成损害。这会引发许多疾病, 包括癌症、动脉粥样硬化、类风湿关节炎、糖尿病、肝损伤和中枢神经系统疾病。

超氧阴离子在免疫系统中起着关键作用, 保护动物免受感染。高活性氧阴离子由受刺激的白细胞释放, 包括单核细胞、巨噬细胞和多形核白细胞。在免疫细胞中, 超氧化物阴离子是由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酶 (NADPH) 氧化酶产生的。

原理: 超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- , NO_2^- 在对氨基苯磺酸和 α -萘胺的作用下, 生成紫红色的偶氮化合物, 在 530nm 处有特征吸收峰, 根据 A530 值可以计算样品中 O_2^- 含量, 反应式为:



自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、研钵/匀浆器、台式离心机、天平、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、氯仿和蒸馏水。

超氧阴离子提取:

1. 植物、动物组织:

植物、动物组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES41 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES41) 进行冰浴匀浆, 然后, 10000g, 4℃, 离心 20min, 取上清置于冰上待测。

2. 血清或培养液: 直接测定。

测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 530nm, 蒸馏水调零;
2. AK295-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min;
3. 标准品的制备: 用蒸馏水将标准品稀释为 0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125、0.00390625μmol/mL 的标准溶液;
4. 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)	标准管(μL)
样本		40	
标准品			40
提取液 ES41	100	60	60
AK295-A	80	80	80
混匀, 37°C水浴 20min			
AK295-B	60	60	60
AK295-C	60	60	60
混匀, 37°C水浴 20min			
AK295-D	100	100	100
混匀, 8000rpm, 25°C, 离心 5min, 小心吸取上层水相 200μL, 测定 A530; 计算ΔA 标准=A 标准管-A 空白管, ΔA 样本=A 测定管-A 空白管。(空白管只需做 1-2 次。)			

超氧阴离子含量计算公式:

标准曲线的绘制: 以ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线 $y=kx+b$ 。

1. 组织:

(1) 按照样本质量计算

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) = 2x \div W$

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}$) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 0.1x \div W$

(2) 按照蛋白质浓度计算

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) = 2x \div C_{\text{pr}}$

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/mg prot} \cdot \text{min}$) = $2x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.1x \div C_{\text{pr}}$

2. 血清或培养液:

超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $2x$

超氧阴离子产生速率 ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$) = $2x \div T = 0.1x$

注: V 提取: 加入提取液体积, 1 mL; V 样本: 反应中样品体积, 0.04mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 2: 2 分子 O_2^- 参与反应生成 1 分子 NO_2^- 。

注意事项:

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定, 并注意计算公式里乘以相应倍数。
2. 样品制备好后, 立刻进行测定, 请勿将样品进行长时间的低温保存, 以免影响测定结果。
3. AK295-D (氯仿) 有一定的毒性, 操作时请做好防护措施。
4. 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)。