

超氧阴离子(Oxygen free radical, OFR)试剂盒说明书

(分光法 48 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 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 10mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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 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、上机检测

① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

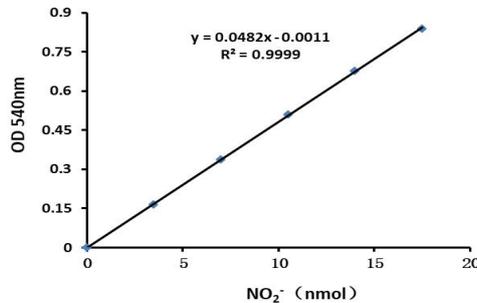
试剂名称 (μL)	测定管	空白管（只做一次）
样本	175	
提取液		175
试剂一	175	175
混匀，37°C反应 10min		

反应 mix	350	350
混匀, 37°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, $\Delta A=A$ 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 50 μ L, 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 175 μ L 增至 300 μ L, 则试剂一减至 50 μ L), 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: 175 μ L 样本+175 μ L 蒸馏水, 混匀, 37°C(可用恒温培养箱)反应 10min, 再加 350 μ L 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(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: $y = 0.0482x - 0.0011$, x 是 NO_2^- 的摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



- 2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div (V1 \div V \times W) \times 2 \times D \\ &= 237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按细菌/细胞计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div (V1 \div V \times 500) \times 2 \times D \\ &= 237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \div 500 \times D \end{aligned}$$

- 4、按照液体体积计算:

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0011) \div 0.0482] \div V1 \times 2 \times D = 237.1 \times (\Delta A + 0.0011) \times D$$

V---提取液的体积, 1mL;

W---样品鲜重, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

标准品亚硝酸钠的分子量---69。

V1---加入反应体系的样品量, 0.175mL;

500---细胞数量, 万;

2---生成 1 个 NO_2^- 需要 2 个 O_2^- ;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (100 μ mol/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, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. μ mol/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。