

# 超氧阴离子含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10282

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 14 mL×1 瓶（自备）	4°C保存
标准品	液体 0.5mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂四：自备氯仿；
- 2、标准品：10 $\mu$ mol/mL 亚硝酸钠。

## 产品说明：

生物体内超氧阴离子等活性氧具有免疫和信号传导的作用，但积累过多时会对细胞膜及生物大分子产生破坏作用，导致机体细胞和组织代谢异常，从而引起多种疾病。

超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>，NO<sub>2</sub><sup>-</sup>在对氨基苯磺酰胺和萘乙二胺盐酸盐的作用下，生成紫红色的偶氮化合物，在 530nm 有特征吸收峰，根据 A<sub>530</sub> 值可以计算样本中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量。

## 技术指标：

最低检出限：0.001451  $\mu$ mol/mL线性范围：0.0019-0.5  $\mu$ mol/mL

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 需自备的仪器和用品：

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

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 植物、动物组织：称取约 0.1g 样本，加入提取液 1mL，充分研磨，12000rpm，4°C，离心 20min，取 20 $\mu$ L 上清测定蛋白含量，其余上清作为待测样本。
2. 血清或培养液：直接测定。

### 二、测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm，蒸馏水调零。

## 2. 标准溶液的制备

取适量亚硝酸钠标准液，将其稀释为 0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125 $\mu\text{mol/mL}$  的标准溶液，用这些标准管做标准曲线。

## 3. 操作表

	空白管	测定管	标准管
标准溶液 ( $\mu\text{L}$ )			40
样本 ( $\mu\text{L}$ )		40	
提取液 ( $\mu\text{L}$ )	100	60	60
试剂一( $\mu\text{L}$ )	80	80	80
混匀, 37°C水浴 20min			
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	60	60	60
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	60	60	60
混匀, 37°C水浴 20min			
试剂四 ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100
混匀, 8000rpm, 25°C, 离心 5min, 小心吸取上层水相 200 $\mu\text{L}$ , 蒸馏水调零, 微量玻璃比色皿/96 孔板, 测定 530nm 处吸光值, 计算 $\Delta A$ 标准=A 标准管-A 空白管, $\Delta A$ 样本=A 测定管-A 空白管。(空白管只需做 1-2 次)			

### 三、超氧阴离子含量计算公式:

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

2. 超氧阴离子含量的计算: 将 $\Delta A$  样本带入方程得到 x 值 ( $\mu\text{mol/mL}$ )。

(1) 按照样本质量计算

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

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

(2) 按照蛋白质浓度计算

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

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

(3) 按照血清或培养液体积计算

$$\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol/mL}) = 2x$$

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

V 样本: 参与反应样本体积, 0.04mL; V 提取: 提取过程中加入的提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 20min。

### 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。
- 2、样本制备好后, 立刻进行测定, 请勿将样本进行长时间的低温保存, 以免影响测定结果。
- 3、试剂四有一定的毒性, 请操作时做好防护措施。

### 实验实例:

1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液充分研磨, 12000rpm, 4°C, 离心 20min, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A$  样本=A 测定管-A 空白管=0.176-0.043=0.133, 标准曲线 $y=2.9968x+0.0129$ , 计算 $x=0.04$ , 按样本质量计算酶活得:

超氧阴离子含量 ( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $2x \div W = 0.8 \mu\text{mol/g}$  质量。

2、取 0.1g 树叶加入 1mL 提取液充分研磨, 12000rpm, 4°C, 离心 20min, 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A$  样本=A 测定管-A 空白管=0.091-0.043=0.048, 标准曲线 $y=2.9968x+0.0129$ , 计算 $x=0.012$ , 按样本质量计算酶活得:

超氧阴离子含量 ( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $2x \div W = 0.24 \mu\text{mol/g}$  质量。

### 相关发表文献:

[1] Bingbing Cai,Qiang Li,Fengjiao Liu,et al. Decreasing fructose-1,6-bisphosphate aldolase activity reduces plant growth and tolerance to chilling stress in tomato seedlings. *physiologia plantarum*. December 2017;

[2] Zhongyuan Liu,Peilong Wang,Tengqian Zhang,et al. Comprehensive analysis of BpHSP genes and their expression under heat stresses in *Betula platyphylla*. *Environmental and Experimental Botany*. August 2018;(IF3.712)

### 参考文献:

[1] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, 6(3): 55-57.