

超氧阴离子含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1295

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	自备试剂	-
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

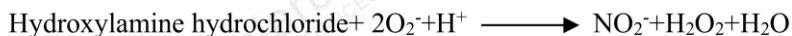
溶液的配制：

- 1、试剂四：自备氯仿，大约需要 12mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
- 2、标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠标准品。
- 3、0.03125μmol/mL 标准品配制：取 100μL 10μmol/mL 亚硝酸钠标准品加 900μL 蒸馏水稀释成 1μmol/mL 的标准品；再取 30μL 1μmol/mL 的标准品加 930μL 蒸馏水稀释成 0.03125μmol/mL 的标准品，用于下述操作表中标准管测定。

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 NO₂⁻，NO₂⁻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 A₅₃₀ 值可以计算样本中 O₂⁻ 含量。



技术指标：

最低检出限：0.001 μmol/mL

线性范围：0.0015-0.25 μmol/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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、天平、水浴锅、离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、氯仿 (>98%，AR)、冰和蒸馏水。





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. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞/细菌：按照细胞/细菌数量（10⁶ 个）：提取液体积（mL）为 5~1：1 的比例（建议 5 百万细胞/细菌加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞/细菌（功率 200w，超声 3 秒，间隔 10 秒，总时间 3min）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测
3. 血清/血浆等液体：直接测定。若有浑浊，离心后取上清使用。

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，分光光度计用蒸馏水调零。
2. 操作表（在 1.5mL EP 管中依次加入以下试剂）:

试剂名称（μL）	空白管	测定管	标准管
标准品	-	-	100
样本	-	100	-
蒸馏水	100	-	-
试剂一	80	80	80
混匀，37℃水浴 20min			
试剂二	60	60	60
试剂三	60	60	60
混匀，37℃水浴 20min			
试剂四（氯仿）	100	100	100
混匀，8000rpm，25℃，离心 5min，小心吸取上层水相 200μL 至微量玻璃比色皿/96 孔板中，在 530nm 处测定吸光值，分别记为 A 空白、A 测定、A 标准，计算ΔA 标准=A 标准-A 空白，ΔA 测定=A 测定-A 空白。（空白管和标准管只需做 1-2 次）			

三、超氧阴离子含量计算公式:

1. 按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/g 质量}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div W \\ &= 0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/min/g 质量}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div W \div T \\ &= 0.003125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

2. 按照样本蛋白质浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times C_{pr}) \\ &= 0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子产生速率} (\mu\text{mol/min/mg prot}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times C_{pr}) \div T \\ &= 0.003125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr} \end{aligned}$$

3. 按照液体样本体积计算:

$$\begin{aligned} \text{超氧阴离子含量} (\mu\text{mol/mL}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \\ &= 0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \div T \\ &= 0.003125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}\end{aligned}$$

4. 按照细胞/细菌数量计算:

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div N \\ &= 0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{超氧阴离子产生速率 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^6 \text{ cell}) &= 2 \times \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div N \div T \\ &= 0.003125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N\end{aligned}$$

C 标准: 标准管的浓度, $0.03125 \mu\text{mol}/\text{mL}$; V 样本: 参与反应样本体积, 0.1mL ; 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 ; N: 细胞/细菌数量, 以 10^6 计; T: 反应时间, 20min ; 2: 2 分子的 O_2^- 反应生成 1 分子 NO_2^- 。

注意事项:

- 1、若 ΔA 测定 < 0.01 , 建议增大样本量或延长第一步反应时间后测定; 若 ΔA 测定 > 1.2 , 建议稀释样本后进行测定, 注意同步修改计算公式。
- 2、样本上清液制备好后, 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、试剂四为有机试剂, 建议每次吸取时更换吸头, 由于该试剂有一定的毒性, 操作时请做好防护措施。

实验实例:

- 1、取 0.1020g 小鼠肺加入 1mL 提取液充分研磨, 12000rpm , 4°C , 离心 10min , 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.415 - 0.040 = 0.375$, ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 = $0.362 - 0.040 = 0.322$, 按样本质量计算超氧阴离子含量得:
超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 质量) = $0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 0.714 \mu\text{mol}/\text{g}$ 质量。
- 2、取 0.1045g 合欢根加入 1mL 提取液充分研磨, 12000rpm , 4°C , 离心 10min , 取上清之后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.116 - 0.040 = 0.076$, ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 = $0.362 - 0.040 = 0.322$, 按样本质量计算超氧阴离子含量得:
超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 质量) = $0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 0.141 \mu\text{mol}/\text{g}$ 质量。
- 3、取 $100 \mu\text{L}$ 小鼠血清, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.082 - 0.040 = 0.042$, ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 = $0.362 - 0.040 = 0.322$, 按液体样本体积计算超氧阴离子含量得:
超氧阴离子含量 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $0.0625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} = 8.15 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Li N, Huang C, Zhang J, Zhang J, Huang J, Li S, Xia X, Wu Z, Chen C, Tang S, Xiao X, Gong H, Dai Y, Mao C, Wan M. Chemotactic NO/H₂S Nanomotors Realizing Cardiac Targeting of G-CSF against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. ACS Nano. 2023 Jul 11;17(13):12573-12593. doi: 10.1021/acsnano.3c02781. Epub 2023 Jun 16. PMID: 37327056.
- [2] Yang H, Xue Y, Li B, Lin Y, Li H, Guo Z, Li W, Fu Z, Ding D, Tang J. The chimeric gene atp6c confers cytoplasmic male sterility in maize by impairing the assembly of the mitochondrial ATP synthase complex. Mol Plant. 2022 May 2;15(5):872-886. doi: 10.1016/j.molp.2022.03.002. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35272047.





[3] Zhang S, Zheng M, Yang G, Zhang T, Magnuson JT, Chen H, Zheng C, Qiu W. Sunlight-mediated CaO₂ inactivation of pathogen indicator organisms in surface water system: Roles of reactive species, characterization of pathogen inactivation. *Water Res.* 2023 Apr 15;233:119756. doi: 10.1016/j.watres.2023.119756. Epub 2023 Feb 18. PMID: 36842331.

[4] Yao H, He Q, Huang C, Wei S, Gong Y, Li X, Liu W, Xu Z, Wu H, Zheng C, Gao Y. Panaxatriol saponin ameliorates myocardial infarction-induced cardiac fibrosis by targeting Keap1/Nrf2 to regulate oxidative stress and inhibit cardiac-fibroblast activation and proliferation. *Free Radic Biol Med.* 2022 Sep;190:264-275. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.016. Epub 2022 Aug 14. Erratum in: *Free Radic Biol Med.* 2023 Jun;202:34. PMID: 35977659.

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.

[2] Elstner EF, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 70(2): 616-620.

相关系列产品:

BC1270/BC1275 蛋白质羰基含量检测试剂盒

BC1320/BC1325 羟自由基清除能力检测试剂盒

BC1410/BC1415 超氧阴离子清除能力检测试剂盒

BC4770/BC4775 ABTS 自由基清除能力检测试剂盒

BC4750/BC4755 DPPH 自由基清除能力检测试剂盒

BC1310/BC1315 总抗氧化能力 (T-AOC) 检测试剂盒 (FRAP 法)

BC0020/BC0025 丙二醛(MDA)含量检测试剂盒

