# 超氧阴离子自由基检测试剂盒(磺胺微板法)

## 产品简介:

超氧阴离子自由基作为生物体代谢过程中产生的一种自由基，可攻击生物大分子，如脂质、蛋白质、核酸和聚不饱和脂肪酸等，使其交联或者断裂，引起细胞结构和功能的破坏，与机体衰老和病变有很密切的关系，清除超氧阴离子自由基的研究已经得到了广泛的关注。生物体内的分子氧可以经过单电子还原转变为超氧阴离子自由基($O_2^-$)，$O_2^-$既可以直接作用于蛋白质和核酸等大分子，也可以衍生为羟自由基、单线态氧、过氧化氢及脂质过氧物自由基等对细胞结构和功能具有破坏作用的活性氧。

超氧阴离子自由基检测试剂盒(磺胺微板法)又称超氧阴离子产生速率检测试剂盒，其检测原理是在酸性条件下，2 份 $O_2^-$与羟胺反应生成 1 份 $NO_2^-$，$NO_2^-$在对氨基苯磺酸和萘胺的作用下反应生成粉红色的偶氮物质，以酶标仪测定 530nm 处吸光度，在一定范围内颜色深浅与 $O_2^-$成正比，根据 $A_{530}$ 及 $NO_2^-$和 $O_2^-$的相关反应中物质的量的关系，可算出样品中 $O_2^-$的浓度，主要用于测定植物组织中的超氧阴离子自由基含量或超氧阴离子的产生速率。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

## 产品组成:

| 编号 / 名称 | GCTO1121 100T | Storage |
|---|---|---|
| 试剂(A): $NO_2^-$标准(1mM) | 1ml | 4℃ 避光 |
| 试剂(B): $O_2^-$ Lysis Buffer | 250ml | RT |
| 试剂(C): 羟胺溶液 | 5ml | 4℃ |
| 试剂(D): 氨基苯磺酸显色液 | 5ml | 4℃ 避光 |
| 试剂(E): 萘胺显色液 | 5ml | 4℃ 避光 |
| 使用说明书 | 1 份 | |

## 自备材料:

1、 实验材料：植物组织(大豆、绿豆、玉米等叶片)、血液、组织样本等

2、 研钵或匀浆器、离心管或试管、低温离心机、恒温箱或水浴锅、酶标仪、96 孔板

## 操作步骤(仅供参考):

1、 准备样品:

①植物样品:取正常或逆境下的新鲜植物组织，清洗干净，擦干，切碎，迅速称取 1~1.5g，加入 2ml 预冷的 $O_2^-$ Lysis Buffer 后冰浴条件下匀浆或研磨，离心 10min，上清液即为

超氧阴离子自由基提取液，4℃保存备用。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，4℃保存，用于超氧阴离子自由基的检测。

③高活性样品：如果样品中含有较高浓度的超氧阴离子自由基，可以使用 $O2^-$ Lysis Buffer 进行恰当的稀释。

2、配制系列 $NO_2^-$标准溶液：取出 $NO_2^-$标准(1mM)恢复至室温后，以 $NO_2^-$标准(1mM)按下表继续稀释：

| 加入物(μl) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $NO_2^-$标准(1mM) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 蒸馏水 | 99 | 98 | 97 | 96 | 95 | 94 |
| $NO_2^-$含量(μM) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |

3、$O_2^-$加样：按照下表设置空白孔、标准孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品中的超氧阴离子自由基浓度过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行孔。

| 加入物(μl) | 空白孔 | 标准孔 | 测定孔 |
|---|---|---|---|
| 蒸馏水 | 100 | — | — |
| 系列 $NO_2^-$标准(1~6 号) | — | 100 | — |
| 待测样品 | — | — | 25 |
| $O_2^-$ Lysis Buffer | — | — | 25 |
| 羟胺溶液 | — | — | 50 |
| 混匀，25℃水浴孵育 | | | |
| 氨基苯磺酸显色液 | 50 | 50 | 50 |
| 萘胺显色液 | 50 | 50 | 50 |
| 混匀，30℃水浴孵育 | | | |

4、$O_2^-$测定：以空白调零，酶标仪测定标准孔、测定孔 530nm 处吸光度(即为 $A_{标准}$、$A_{测定}$)。

**计算：**以系列 $NO_2^-$标准(1～6 号孔)含量(μM)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，制作标准曲线，根据测定孔的吸光度进而计算 $NO_2^-$含量。根据如下公式计算具体样品中超氧阴离子自由基($O_2^-$)的含量：

**植物组织样品 $O_2^-$(μM/g)=2×n×$V_T$/(W×$V_S$)**

**血清、尿液等样品 $O_2^-$(μM/ml)=2×n×N/$V_S$**

超氧阴离子的产生速率的定义：每分钟每克鲜重组织产生的超氧阴离子的物质的量，计

算公式如下：

**超氧阴离子产生速率【μmol/(min*g)】=2×n×$V_T$/(W×t×$V_S$)**

测得样品中蛋白质含量后，可用下面公式表示：

**超氧阴离子产生速率【μmol/(min*mg)】=2×n×$V_T$/(m×t×$V_S$)**

式中：2=$NO_2^-$与 $O_2^-$间的化学计量数

n=从标准曲线上查得的 $NO_2^-$含量(μM)

$V_T$=超氧阴离子自由基提取液总体积(ml)

N=样品稀释倍数

W=样品鲜重(g)

m=样品中蛋白质含量(mg)

t=样品与羟胺的反应时间(min)=20

$V_S$=测定时加入提取液体积(ml)

**注意事项：**

1、 实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即使用，应存于 4℃。

2、 如果样品中含有较多的叶绿素，会干扰测定结果，可在加入羟胺溶液 25℃水浴孵育 20min 后用等体积乙醚或三氯甲烷萃取叶绿素，再行显色反应。

3、 如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑最小检测体积。

4、 所测样本的浓度过高，应用 $O_2^-$ Lysis Buffer 稀释样品后重新测定。

5、 氨基苯磺酸显色液和萘胺显色液有强烈的刺激性，尽量在通风条件好的地方操作，用后需拧紧瓶盖，避免挥发。

6、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

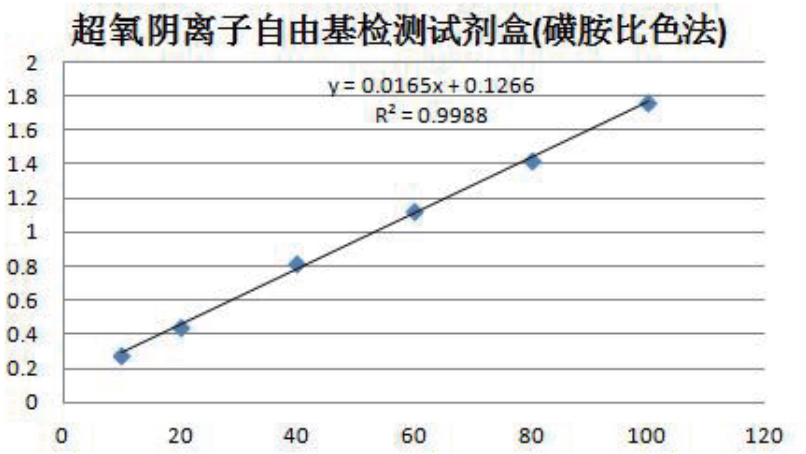
**有效期：** 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

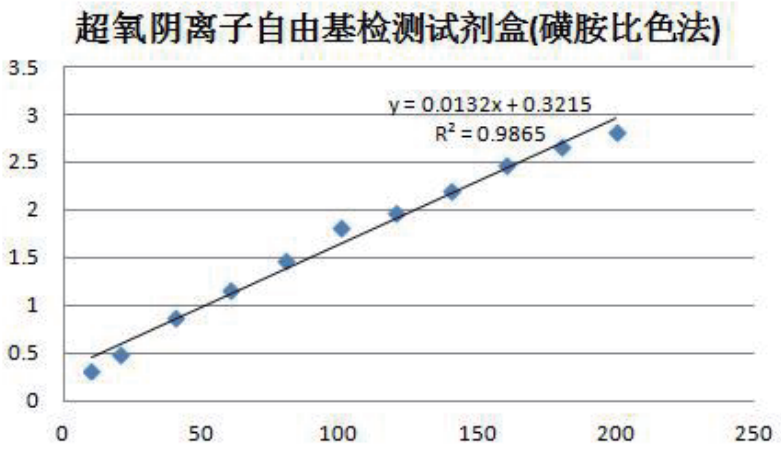
**相关产品：**

| 产品编号 | 产品名称 |
|---|---|
| GCDH0006 | 苏木素伊红(HE)染色液(醇溶) |
| GCDF0135 | 组织细胞固定液(4% PFA) |
| GCNR0001 | DEPC 处理水(0.1%) |
| GCPS0013 | RIPA 裂解液(强) |
| GCTC0699 | 植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法) |
| GCTO1013 | 丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法) |

**附录：**参考标准曲线范围：

测定 $NO_2^-$标准 10、20、40、60、80、100、120、140、160、180、200μM在530nm 的吸光度，据此做出其标准曲线如下：




根据结果可以看出 $NO_2^-$标准在 160μM 以上时，OD 值会有偏差，因此样品的 $O_2^-$应小于 320μM。

