

# 超氧阴离子检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1049

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

检测范围：1 $\mu$ M-200 $\mu$ mol/L（NaNO<sub>2</sub>标准品浓度）

灵敏度：1 $\mu$ mol/L（NaNO<sub>2</sub>标准品浓度）

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细胞上清

## 产品简介

生物体内超氧阴离子（OFR）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。本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于分析各种生物样本中超氧阴离子含量，其原理是样本中的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>与格里斯试剂反应，格里斯分析的机理概括为重氮类之间的偶氮耦合，重氮类是由磺胺和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>和 N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐产生的，生成红色的偶氮化合物，在 540nm 处有特征吸收峰，根据 540nm 处吸光度的变化可以计算样品中超氧阴离子含量。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃保存
试剂一	5mL	10mL	4℃保存
试剂二	4mL	8mL	4℃避光保存
试剂三	4mL	8mL	4℃避光保存
NaNO <sub>2</sub> 标准品（10mmol/L）	0.5mL	0.5mL	4℃保存

## 自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 540nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、制冰机

三氯甲烷、去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

标准曲线设置：取 20 $\mu$ L 的 NaNO<sub>2</sub> 标准品（10mmol/L），用 980 $\mu$ L 提取液稀释至 200 $\mu$ mol/L，然后按下表所示，用提取液进一步稀释标准品。

	200 $\mu$ mol/L NaNO <sub>2</sub> 标准品体积（ $\mu$ L）	提取液体积（ $\mu$ L）	标准品浓度（ $\mu$ mol/L）
Std. 1	200	0	200

## 产品说明书

Std. 2	100	100	100
Std. 3	50	150	50
Std. 4	20	180	20
Std. 5	10	190	10
Std. 6	5	195	5
Std. 7	2	198	2
Std. 8	1	199	1

**注意：每次实验，请使用新配制的标准品。**

### 样本制备

动物组织：称取 0.1g 组织，加 1mL 提取液进行冰浴匀浆。12,000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

植物组织：称取 0.1g 组织，尽量剪碎，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆或冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。12,000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

细胞：收集  $5 \times 10^6$  个细胞，用冷 PBS 清洗细胞后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。12,000rpm，4℃，离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）、细胞上清等液体样本：直接测定。

**注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 6 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。**

### 实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，可见分光光度计去离子水调零。

2. 样本测定：

	对照管 (μL)	空白管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)
不同浓度标准品	0	0	0	40
样本	40	0	40	0
提取液	140	100	60	60
试剂一	0	80	80	80

混匀，37℃水浴 20min

试剂二	60	60	60	60
试剂三	60	60	60	60

混匀，37℃水浴 20min

三氯甲烷	100	100	100	100
------	-----	-----	-----	-----

混匀，8,000rpm，25℃，离心 5min，吸取 200 μL 上清于 96 孔板或微量玻璃比色皿中测定 540nm 处吸光值，

记为 A。  $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{对照}$ ，  $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$

**注意：每个样本都需要设置一个对照孔排除样本本身存在的  $NO_2^-$  的影响，因此 96T 只能测 48 个样本。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  $\Delta A_{测}$  小于 0.001 可适当加大样本量。如果  $\Delta A_{测}$  大于 1.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。**

### 结果计算

1. 标准曲线的绘制：

## 产品说明书

以标准溶液浓度为  $y$  轴， $\Delta A_{\text{标}}$  为  $x$  轴，绘制标准曲线（浓度为  $y$  轴更方便计算结果）。 $\Delta A_{\text{测}}$  带入方程得到  $y$  值（ $\mu\text{mol/L}$  即  $\text{nmol/mL}$ ）。

### 2. 超氧阴离子含量的计算：

（1）按样本鲜重计算：

超氧阴离子含量 ( $\text{nmol/g}$  鲜重)  $= y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \times n = 2y \div W \times n$

超氧阴离子产生速率 ( $\text{nmol/min/g}$  鲜重)  $= 2y \div W \div T = 0.1y \div W \times n$

（2）按样本蛋白浓度计算：

超氧阴离子含量 ( $\text{nmol/mg prot}$ )  $= y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times 2 \times n = 2y \div \text{Cpr} \times n$

超氧阴离子产生速率 ( $\text{nmol/min/mg prot}$ )  $= 2y \div \text{Cpr} \times n \div T = 0.1y \div \text{Cpr} \times n$

（3）按细胞数量计算：

超氧阴离子含量 ( $\text{nmol}/10^4 \text{ cell}$ )  $= y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \times 2 \times n = 0.004y \times n$

超氧阴离子产生速率 ( $\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}$ )  $= 0.004y \times n \div T = 0.0002y \times n$

（4）按照血清（浆）或培养液体积计算：

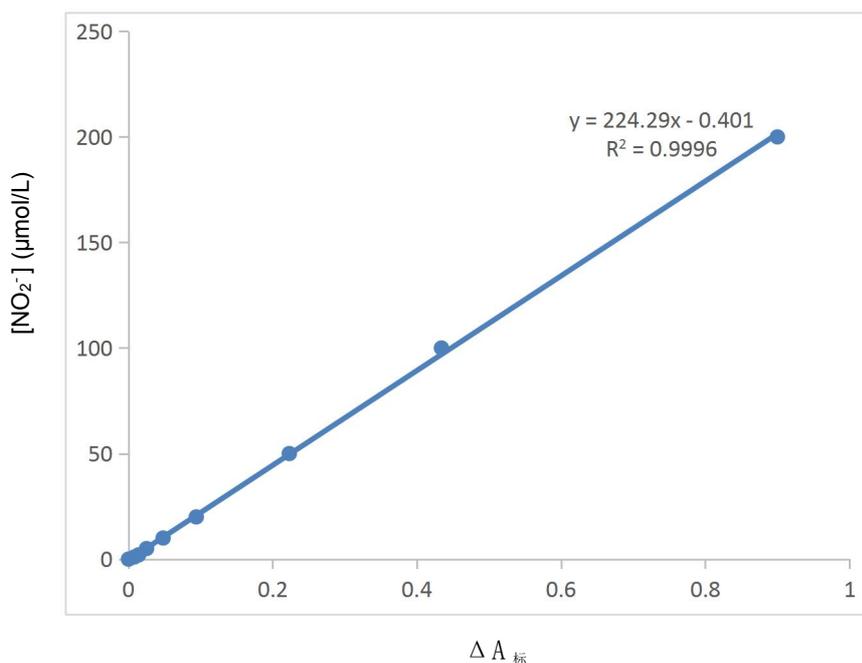
超氧阴离子含量 ( $\text{nmol/mL}$ )  $= y \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 2 \times n = 2y \times n$

超氧阴离子产生速率 ( $\text{nmol/min/mg prot}$ )  $= 2y \times n \div T = 0.1y \times n$

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.04mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； $W$ ：样品质量，0.1g； $T$ ：反应时间，20min；2：2分子超氧阴离子参与反应生成1分子 $\text{NO}_2^-$ ； $n$ ：样本稀释倍数；500：细胞数量，500万； $\text{Cpr}$ ：样本蛋白质浓度， $\text{mg/mL}$ 。

### 结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

## 产品说明书

- PMK1036 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1041 黄嘌呤氧化酶 (XO) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1040 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1061 超氧阴离子清除能力检测试剂盒 (微量法)
- PMK1039 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1047 蛋白质羰基检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

