

超氧阴离子检测 试剂盒（分光法）

货号：PMK1049BKS

规格：25 管/12S 50 管/24S

检测方法：比色法

储存条件：-20℃避光保存 12 个月

💡 建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、产品简介

研究背景：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。

检测原理：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_2^- ， NO_2^- 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_2^- 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。

检测范围：0.5 μM -50 $\mu\text{mol/L}$ （ NaNO_2 标准品浓度）灵敏度：0.5 $\mu\text{mol/L}$ （ NaNO_2 标准品浓度）

📊 **检测意义：**氧化应激机制研究、病理机制揭示、药效/毒理评价。

🔑 **适用样本：**动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）、培养上清等液体样本。

二、产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	25 管	50 管	
提取液	45mL	90mL	4℃保存
试剂一	15mL	30mL	4℃保存
试剂二	20mL	40mL	4℃避光保存
试剂三	20mL	40mL	4℃避光保存
标准品（1M NaNO_2 ）	1mL	1mL	-20℃，避光保存

三、需自备的仪器和用品

📖 分光光度计（能测 540nm 处的吸光度）及水浴锅、比色皿、可调节式移液枪及枪头、离心机、制冰机、氯仿、去离子水、匀浆器。（如果是组织样本）

四、试剂准备

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 10 μL NaNO_2 标准品（1M）用 990 μL 提取液稀释至 10mM NaNO_2 。取 10 μL

的 NaNO_2 标准品 (10mmol/L), 用 990 μL 提取液稀释至 100 $\mu\text{mol/L}$, 然后按下表所示, 用提取液进一步稀释标准品。

	100 $\mu\text{mol/L}$ NaNO_2 标准品体积 (μL)	提取液体积 (μL)	标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
Std.1	400	400	50
Std.2	160	640	20
Std.3	80	720	10
Std.4	40	760	5
Std.5	16	784	2
Std.6	8	792	1
Std.7	4	796	0.5

 注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

五、样本制备

动物组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆。12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上检测。

植物组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，再冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上检测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 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）。12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上检测。

血清（浆）、细胞上清等液体样本：直接检测，若有浑浊离心后取上清，根据预实验确定稀释倍数。

 注意：1. 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。

2. 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。

六、实验步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，去离子水调零。

2. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	对照管 (mL)	测定管 (mL)	空白管 (mL)	标准管 (mL)
不同浓度标准品	0	0	0	0.3
样本	0.3	0.3	0	0
提取液	1.05	0.45	0.75	0.45
试剂一	0	0.6	0.6	0.6

混匀，37℃水浴 20min

试剂二	0.45	0.45	0.45	0.45
试剂三	0.45	0.45	0.45	0.45

混匀，37℃水浴 20min

氯仿	0.75	0.75	0.75	0.75
----	------	------	------	------

混匀，8,000g，25℃，离心5min，取出2mL上层水相于比色皿中测定540nm处吸光值，记为A。 $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ （空白和标准曲线只需做1次）。

注意：1. 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50管只能测24个样本。

2. 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。

3. 该反应体系是按照常规的容量3mL左右的比色皿设计的，如果比色皿最适合的加样体积不是2mL左右，可以根据实际需要的体积按比例调整。

七、结果计算

1. 标准曲线的绘制：

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

2. 样本中超氧阴离子含量计算：

（1）按样本鲜重计算：

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

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

（2）按样本蛋白浓度计算：

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

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

（3）按细胞数量计算：

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

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

（4）按照血清（浆）或培养液体积计算：

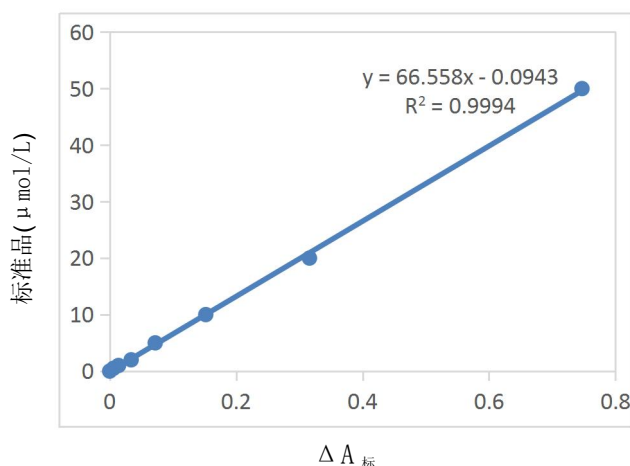
$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mL)} = y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times 2 \times n = 2y \times n$$

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

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.28mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；W：样品质量，g；T：反应时间，20min；2：2分子超氧阴离子参与反应生成1分子 NO_2^- ；n：样本稀释倍数；500：细胞数量，500万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线



附录：常见问题与解决方案（FAQ）

问题	解决措施
计算时如果选择合适的计算公式？	动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度
	植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白
	血液或是其他液态样品，可建议用体积计算
	如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。
测定时如何进行调零？	除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。
试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？	通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 提取液，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 提取液提取。后续操作不变。
	对于数量少的样品，一方面可以减少提取液体积，另一方面还可以延长反应时间。

✦ 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：

PMK1036BKS 超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（分光法）

PMK1040BKS 丙二醛（MDA）检测试剂盒（分光法）

PMK1037BKS 过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒（分光法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

