

抑制与产生超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A052-1-1 比色法 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 液体 5mL×1 瓶 (天冷时或放冰箱会有部分结晶析出, 需 37℃ 水浴溶解后再用), 4℃ 保存; 用时按 1: 9 的比例加双蒸水混合配成**试剂一应用液**, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 5mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 5mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂四: **贮备液** 350 μ L×1 支, -20℃ 保存; **稀释液** 5mL×1 瓶, 4℃ 保存。用时按**贮备液: 稀释液=1: 14** 比例配制成试剂四应用液, 置冰上备用, 现用现配。

试剂五: 粉剂×1 支, 用时加双蒸水 37.5mL 加热至 70~80℃ 溶解。配好后 4℃ 避光保存。

试剂六: 粉剂×1 支, 用时加双蒸水 37.5mL 溶解后备用, 配好后的试剂 4℃ 避光保存。

显色剂的配制: 按照试剂五溶液: 试剂六溶液: 冰乙酸=3: 3: 2 的体积比配置, 4℃ 避光保存。

试剂七: Vc 标准品×4 支。用时将一支 Vc 标准品加双蒸水定容至 5mL (Vc 标准配制后当天内使用) 配成 Vc 标准贮备液, 再取 1mL 该贮备液加 4mL 双蒸水 (5 倍稀释) 配成 **0.15mg/mL Vc 标准品应用液**, 现用现配。

[注]: Vc 标准品配置后见光极易分解, 配制的 **0.15mg/mL Vc 标准应用液需 30 分钟内检测 (按操作表与试剂混合)**

二、测定原理:

模拟机体中黄嘌呤与黄嘌呤氧化酶反应系统, 产生超氧阴离子自由基, 加入电子传递物质及 gress 氏显色剂, 使反应体系呈现紫红色, 可用分光光度计测其吸光度, 当被测样本中含有超氧阴离子自由基抑制剂时, 则比色时测定管的吸光度低于对照管的吸光度, 而如果被测样本中含有产生超氧阴离子自由基物质时, 则比色时测定管的吸光度高于对照管的吸光度, 通过以维生素 C 做标准, 可计算出被检物品对超氧阴离子自由基的影响能力。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅或恒温箱、电炉 (试剂配制时加热用)、烧杯及玻璃棒、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、冰乙酸 (分析纯)、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

四、样本前处理:

- ①、血清 (浆) 样本:** (采血时必须避免溶血) 血清 (浆) 直接使用, 样本 4℃ 存放最好当天检测, 如来不及可放零度以下冷冻保存, 温度越低存放时间越长。
- ②、组织样本:** 准确称取待测组织的重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10% 的组织匀浆 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行测定。(取部分上清液测定蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本所有售, 推荐使用本所的考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒)
- ③、细胞样本:** 收集细胞 (贴壁胰酶消化或细胞刮刮下, 转移到离心管中 1000-2000 转/分钟离心 5 分钟后弃去上清留沉淀, 悬浮细胞直接转以后离心收集沉淀), 加 0.5-1mL 的 PBS 清洗 1~2 次, 1000-2000 转/分钟离心收集沉淀细胞, 再加入 0.3~0.5mL 0.1M PH 7.4

的等渗 PBS 缓冲液悬浮细胞, 超声或手动研磨破碎细胞, 取破碎后的细胞悬液 (若悬液有明显颗粒物或絮状物, 可 2000 转/分钟离心 10 分钟后取上清使用) 待测。

五、操作表:

	对照管	标准管	测定管
试剂一应用液 (mL)	1.0	1.0	1.0
双蒸水 (mL)	0.05		
0.15mg/mL Vc 标准液 (mL)		0.05	
样品 (mL)			0.05
试剂二 (mL)	0.1	0.1	0.1
试剂三 (mL)	0.1	0.1	0.1
试剂四应用液 (mL)	0.1	0.1	0.1
用旋涡混匀器充分混匀, 置 37℃ 恒温水浴 40 分钟			
显色剂 (mL)	2.0	2.0	2.0
混匀, 室温静置 10 分钟, 双蒸水调零, 1cm 光径, 波长 550nm 比色。			

[注]: **最佳取样浓度:** 因反应体系中在规定的底物浓度下, 各种物质抗 $O_2^{\cdot-}$ 能力不一样, 根据朗伯—比耳定律, 样本浓度不可太大也不可太小, 否则影响结果。因此在正式实验前必须做预试以确定最佳取样浓度。(详见附录 I)

六、计算公式: (因各种物质不同, 则定义及计算公式也不一样, 具体如下:)

(一) 血清 (浆) 等液体样本中抗超氧阴离子自由基活力单位的公式及计算:

- 1、定义:** 在反应系统中, 每升血清 (浆) 或液体样本在 37℃ 反应 40 分钟所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位 U。

2、计算公式:

$$\text{抗超氧阴离子能力 (U/L)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \times N$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 0.15mg/mL;

1000: 单位换算, mL→L;

N: 样本测试前稀释倍数。

(二) 组织、细胞中抗超氧阴离子自由基活力单位的公式及计算:

- 1、定义:** 在反应系统中, 每克组织 (细胞) 蛋白在 37℃ 反应 40 分钟所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位 U。

2、计算公式:

$$\text{抗超氧阴离子能力 (U/gprot)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 0.15mg/mL;

1000: 单位换算, mL→L;

C_{pr} : 相应组织样本浓度下的蛋白浓度, prot 指蛋白。

七、本法尚可检测产生超氧阴离子的改变, 例如白细胞, 某些中西药物等。其计算公式如下:

- 1、定义:** 在反应系统中, 每升 (克) 物质在 37℃ 反应 40 分钟所产生的超氧阴离子自由基相当于 1mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。

2、计算公式:

公式一:

$$\text{产生超氧阴离子能力 (U/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \times N$$

公式二:

$$\text{产生超氧阴离子能力 (U/g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \div \frac{W}{V_{\text{提}}}$$

(其中 W 表示样本重量 (g), $V_{\text{提}}$ 表示提取液的总体积 (L))

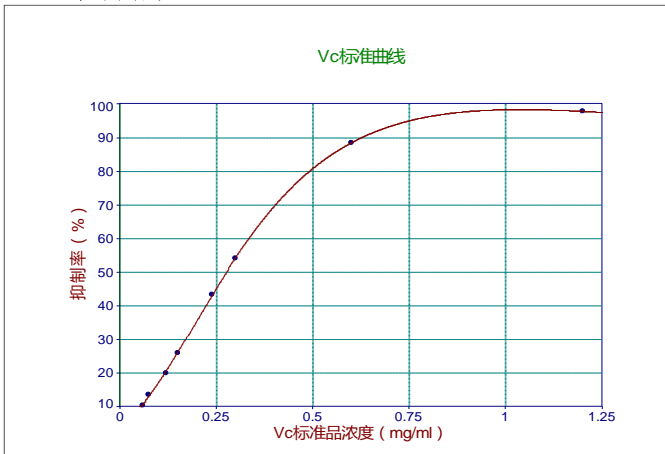
附录 I: Vc 标准曲线的制备

1、前处理: 取 Vc 标准品一支, 用双蒸水配制成不同浓度的标准应用液待测

2、操作表:

	对照管	标准管
试剂一 (mL)	1.0	1.0
双蒸水 (mL)	0.05	
0.15mg/mL Vc 标准品 (mL)		0.05
试剂二 (mL)	0.1	0.1
试剂三 (mL)	0.1	0.1
试剂四 (mL)	0.1	0.1
用旋涡混匀器充分混匀, 置 37°C 恒温水浴 40 分钟		
显色剂 (mL)	2.0	2.0
混匀, 10 分钟后倒入 1cm 光径比色杯中, 双蒸水调零, 波长 550nm 处比色。		

3、检测结果:



从上面标准曲线来看, 抑制率在 10%~60% 之间成线性关系。取百分抑制率在 40%~50% 左右的一管作为最佳取样浓度, 若百分抑制率大于 60% 时 (曲线的平坦部分), 则需将样品浓度稀释后再测试。若百分抑制率小于 10% 时, 则需将样品浓度增加后测试。

注: 抑制率 (%) = $\frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定/标准 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \times 100\%$

这样做对科研结果分析及 t 检验有很大帮助: 若百分抑制率大于 60% 或小于 10%, 各个测定组的结果在 t 检验中常常无显著性差异。

另外, 用户标准曲线可以不做, 直接套用计算公式计算即可, 结果无影响。

附录 II: 脂血样本的测定

1、操作表:

	对照管	标准管	测定管	测定空白管
试剂一 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
双蒸水 (mL)	0.05			
0.15mg/mL Vc 标准品 (mL)		0.05		
样品 (mL)			0.05	
试剂二 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
试剂三 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
试剂四 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
用旋涡混匀器充分混匀, 置 37°C 恒温水浴 40 分钟				
显色剂 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0
样本 (mL)				0.05
三氯甲烷 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05
混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清, 双蒸水调零, 1cm 光径, 波长 550nm 处比色。				

2、计算公式:

定义: 在反应系统中, 每升血清 (浆) 在 37°C 反应 40 分钟所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。

计算公式:

$$\text{抗超氧阴离子能力 (U/L)} = \frac{A_{\text{测定空白}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \times N$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 0.15mg/mL;

1000: 单位换算, mL → L;

N: 样本测试前稀释倍数。

3、注意事项:

- ①、因反应体系中在规定的底物浓度下, 各种物质抗 O_2^- 能力不一样, 取样浓度不可太大或太小, 否则影响结果。因此在正式实验前必须做预试以确定最佳取样浓度。
- ②、一般的含脂类的标本都可以按照这个操作表操作, 排除脂类对测定的干扰。
- ③、三氯甲烷需要老师自备, 并且对于一些重度高脂, 有可能会加完与样本等量的氯仿后上清还是浑浊, 这时候就需要老师再加大大量氯仿的量, 再次混匀离心至上清澄清。