

超氧阴离子含量/超氧阴离子产生速率测试盒说明书

货号：RX881W48 规格：48 样 方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本上清进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 样品制备好后请置于冰上待测，请勿长时间低温保存，以免影响测定结果。
5. 加完试剂四后请务必混匀。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	50 mL×1	4℃	
试剂一	4.2 mL×1	4℃	
试剂二	3.5 mL×1	4℃避光	
试剂三	3.5 mL×1	4℃避光	
试剂四（氯仿）	5 mL×1	避光	自备

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 植物、动物组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后，10000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min）；然后 10000g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本
3. 血清或培养液：直接测定。

五、测定步骤：

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 530 nm 处。

2.在 1.5 mL 离心管中依次加入下列样本及试剂:

	测定管	空白管
样本 (μL)	100	-
蒸馏水 (μL)	-	100
试剂一 (μL)	80	80
充分混匀后, 混匀, 37°C水浴 20 min。		
试剂二 (μL)	60	60
试剂三 (μL)	60	60
充分混匀后, 混匀, 37°C水浴 20 min。		
试剂四 (μL)	100	100
充分混匀, 10000g, 常温, 离心 5 min, 小心吸取上层水相 200 μL 于 96 孔板中, 测定 A530。ΔA=A 测定-A 空白, 空白管只要做 2~3 管。		

六、计算:

标准条件下测得回归方程为 $y=0.012x+0.006$, $R^2=0.9999$, x 为标准品浓度 (nmol/mL), y 为吸光值 A。

1. 按照样本质量计算:

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.006) \div 0.012 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 = 300 \times (\Delta A - 0.006) \div W$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/g} \cdot \text{min)} = (\Delta A - 0.006) \div 0.012 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \div T = 15 \times (\Delta A - 0.006) \div W$$

2. 按照蛋白质浓度计算:

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/mg prot)} = (\Delta A - 0.0051) \div 7.7666 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \div C_{\text{pr}} = 300 \times (\Delta A - 0.006) \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/mg prot} \cdot \text{min)} = (\Delta A - 0.006) \div 0.012 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 2 \div T \div C_{\text{pr}} = 15 \times (\Delta A - 0.006) \div C_{\text{pr}}$$

3.2. 细菌, 真菌:

$$\text{超氧阴离子含量 (nmol/10}^4\text{cell)} = (\Delta A - 0.006) \div 0.012 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 2 = 300 \times (\Delta A - 0.006) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

$$\text{超氧阴离子产生速率 (nmol/10}^4\text{cell} \cdot \text{min)} = 300 \times (\Delta A - 0.006) \div \text{细胞数量} \div T = 15 \times$$

$(\Delta A - 0.006) \div \text{细胞数量}$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 反总：反应总体积，0.18 mL；V 样：反应中样品体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；T：反应时间，20 min；2：2 分子 O^{2-} 参与反应生成 1 分子 NO_2^- 。

七、产品简介

超氧阴离子是植物在正常代谢和逆境胁迫下产生的最初、最主要的活性氧之一。当植物遭遇胁迫时，细胞内的代谢平衡会被打乱，导致超氧阴离子大量产生。如果其产生速率超过了植物自身抗氧化系统（如超氧化物歧化酶 SOD 等）的清除能力，就会造成氧化损伤，因此，检测其含量和产生速率，能直接反映植物所受的氧化压力大小和内部防御系统的情况。