

抑制与产生超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 测定试剂盒

(货号: BC101 比色法 50 管/48 样)

一、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。

二、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°C 水浴溶解后再用), 4°C 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°C 保存。

试剂二: 液体 5mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂三: 液体 5mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂四: **贮备液** 350μL×1 支, -20°C 保存; **稀释液** 5mL×1 瓶, 4°C 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°C 溶解。配好后 4°C 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°C 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°C 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 分钟内按操作表进行操作。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (550nm) 及 96 孔板), 37°C 水浴锅 (或恒温箱), 涡旋混匀器, 电炉 (配试剂加热用), 蒸馏水, 冰乙酸 (分析纯, 乙酸浓度≥99.5%), 生理盐水, 三氯甲烷 (分析纯, 高脂样本用), 蛋白测定试剂 (组织类样本用, 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°C 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°C 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(或是每管吸取 200μL 反应液上清加到 96 孔板中,酶标仪 520nm 处读数)。			

[注]：因反应体系中在规定的底物浓度下，各种物质抗 O₂⁻ 能力不同，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 II 结果分析）

六、计算公式及举例：（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：

- 定义：**在反应系统中，每升血清（浆）或液体样本在 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 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_{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、计算举例：

取血清 50μL 进行按操作表检测，测得对照管 OD 值为 0.570，测定管 OD 值为 0.230，标准管 OD 值为 0.256，标准管的浓度为 0.15mg/mL。则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{血清抗超氧阴离子能力 (U/L)} &= \frac{0.570 - 0.230}{0.570 - 0.256} \times 0.15 \times 1000 \times 1 \\ &= 162.42 \text{ U/L} \end{aligned}$$

（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：

- 定义：**在反应系统中，每克组织（细胞）蛋白在 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 U。

2、计算公式：

① 按蛋白浓度计算：

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

② 按样本质量计算:

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

$C_{\text{标准}}$:标准品浓度,0.15mg/mL;

1000:单位换算,mL→L;

Cpr:相应组织样本浓度下的蛋白浓度, prot 指蛋白;

W: 组织重量, g。

3、计算举例:

取 1%大鼠胃粘膜匀浆 50 μ L 进行抗超氧阴离子检测, 测得对照管 OD 值为 0.506, 测定管 OD 值为 0.267, 标准管 OD 值为 0.265, 蛋白浓度 0.657mgprot/mL, 标准管 Vc 标准品的浓度为 0.15mg/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{组织抗超氧阴离子能力 (U/gprot)} &= \frac{0.506 - 0.267}{0.506 - 0.265} \times 0.15 \times 1000 \div 0.657 \\ &= 226.42 \text{ U/gprot} \end{aligned}$$

七、本法尚可检测产生超氧阴离子的能力, 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 $^{\circ}$ C 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:

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

$C_{\text{标准}}$:标准品浓度,0.15mg/mL;

1000:单位换算,mL→L;

Cpr:相应组织样本浓度下的蛋白浓度, prot 指蛋白;

W: 组织重量, g。

附录 I：高脂样本的测定

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(或是每管吸取 200μL 反应液上清加到 96 孔板中，酶标仪 520nm 处读数)。				

2、计算公式：与前页一致。

3、计算举例：

取 0.05mL 羊乳酶解液按照上面操作表操作，测得测定管 OD 为 0.346，测定空白管 OD 为 0.539，对照管 OD 为 0.549，标准管 OD 为 0.293，则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{血清抗超氧阴离子} \\ \text{能力 (U/L)} &= \frac{0.539 - 0.346}{0.549 - 0.293} \times 0.15 \times 1000 \times 1 \\ &= 113.0859 \text{ U/L} \end{aligned}$$

4、注意事项：

- ①、一般的含脂较高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。
- ②、三氯甲烷需要用户自备，并且对于一些重度高脂，有可能出现加完与样本等量的氯仿后上清还是浑浊，这时候就需要再加大氯仿的量，再次混匀离心至上清澄清方可比色。
- ③、高脂样本在吸取样本时注意先混匀样本再吸取，以防止样本不均匀造成的结果偏差。

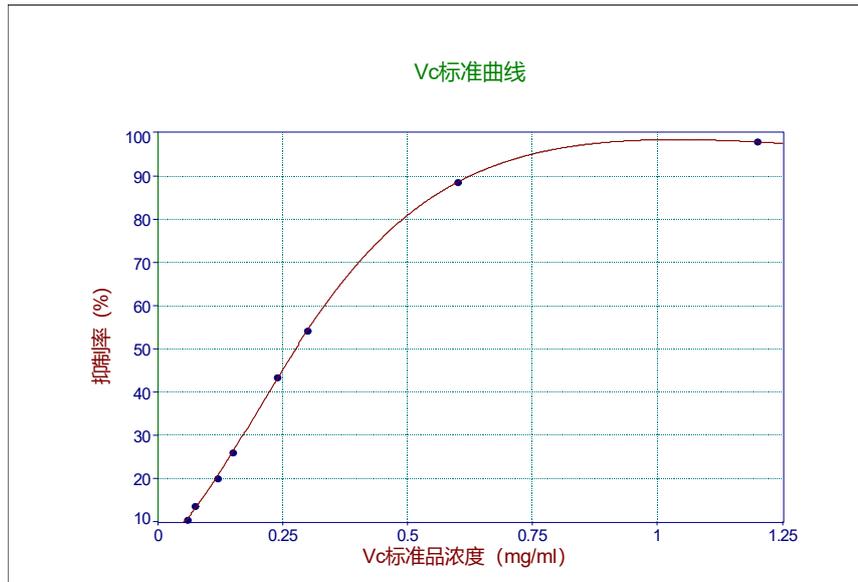
附录 II：Vc 标准曲线的制备

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、检测结果及分析：



从上面标准曲线来看，抑制率在 10%~60% 之间成线性关系，所以（对样本而言）取百分抑制率在 40%~50% 之间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。

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

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。