

# 抗超氧阴离子自由基及生产超氧阴离子自由基测试盒

说明书修订日期：2015.07.13

Cat number: KGT012

Store at 4°C for 6 months

For Research Use Only (科研专用)

## 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  $O_2^-$ ，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  $O_2^-$  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  $O_2^-$  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  $O_2^-$  的影响能力。

## 二、试剂盒组份

组份	KGT012 50 assays
Buffer A	5.0 mL
Buffer B	5.0 mL
Buffer C	5.0 mL
Buffer D	350 $\mu$ L
Buffer D 稀释液	5.0 mL
试剂 E	1 支
试剂 F	1 支
Vc 标准品	4 支

## 注意事项

1. Buffer A 室温较低时会有部分结晶析出，溶解后加蒸馏水稀释 10 倍至 1× Buffer A50ml。
2. Buffer D 用前用 Buffer D 稀释液按 1：14 稀释至 1×Buffer D（不可冷冻，4°C 可保存 2 个月）。
3. 试剂 E 配制：将试剂加入蒸馏水 37.5 mL 中溶解后备用，4°C 避光保存。
4. 试剂 F 配制：将试剂加入蒸馏水 37.5 mL 中溶解后备用，4°C 避光保存。
5. 显色剂配制：试剂 E：试剂 F：冰乙酸=3：3：2 的体积比配制，4°C 避光保存（冰乙酸自备）。
6. Vc 标准贮备液配制：将一支 Vc 标准品加蒸馏水定容至 5ml（Vc 标准配制后当天内使用）

Vc 标准品工作液（0.15mg/ml）配制：取 1ml 贮备液加 4ml 蒸馏水，5 倍稀释现配现用。

Vc 标准品配制后见光极易分解，配制的 0.15mg/ml Vc 标准品工作液需 30 分钟内检测。

### 三、操作步骤

试剂	测定管	对照管	标准管
1× Buffer A (mL)	1.0	1.0	1.0
蒸馏水 (mL)		0.05	
0.15mg/ml Vc 标准品(mL)			0.05
样品 (ml)	0.05		
Buffer B (mL)	0.1	0.1	0.1
Buffer C (mL)	0.1	0.1	0.1
1×Buffer D (mL)	0.1	0.1	0.1
用涡旋混匀器充分混匀，置 37 水浴 40 分钟			
显色剂 (ml)	2.0	2.0	2.0

10min 后倒入 1cm 光径比色杯中，蒸馏水调零，波长 550nm 处比色。

注：最佳取样量：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，根据朗伯—比尔定律，取样量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验以确定最佳取样量。

### 四、计算及举例（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）中抗超氧阴离子自由基活力单位的公式及计算：

##### 1、血清（浆）中抗超氧阴离子自由基活力单位的定义：

在反应体系中，每升血清（浆）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。

##### 2、公式：

血清（浆）中抗超氧阴离子活力单位(U/L) =  $\frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度} - \text{标准管吸光度}} \times \text{标准浓度} (0.15\text{mg/ml}) \times 1000\text{ml} \times \text{样本测试前的稀释倍数}$

##### 3、举例：

取血清 50μl 进行抗超氧化阴离子检测，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，标准管浓度为 0.15mg/ml Vc 标准品。则计算结果为：

$$\text{血清（浆）中抗超氧阴离子活力单位}(U/L) = \frac{0.570 - 0.230}{0.570 - 0.256} \times 0.15 \times 1000 \times 1 = 162.42(U/L)$$

#### （二）组织中抗超氧阴离子自由基活力单位的公式及计算：

##### 1、组织中抗超氧阴离子自由基活力单位的定义：

在反应体系中，每克组织蛋白在 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。

##### 2、公式：

组织中抗超氧阴离子活力单位 (U / gprot) =  $\frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度} - \text{标准管吸光度}} \times \text{标准浓度} (0.15\text{mg/ml}) \times 1000\text{ml} \div \text{蛋白含量} (\text{gprot/L})$

### 3、举例：

取 1%大鼠胃粘膜匀浆 50 $\mu$ 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，蛋白含量 0.657mgprot/ml，标准管 Vc 标准品的浓度为 0.15mg/ml。则计算结果为：

$$\text{组织中抗超氧阴离子活力单位 (U / gprot)} = \frac{0.506 - 0.267}{0.506 - 0.265} \times 0.15 \times 1000 \div 0.657 = 226.42(\text{U} / \text{gprot})$$

## 五、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：在反应体系中，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、公式：

#### 公式①：

$$\text{产生超氧阴离子活力单位(U / L)} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度} - \text{标准管吸光度}} \times \text{标准浓度} (0.15\text{mg/ml}) \times 1000\text{ml} \times \text{样本测试前的稀释倍数}$$

#### 公式②：

$$\text{产生超氧阴离子活力单位 (U / g)} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度} - \text{标准管吸光度}} \times \text{标准浓度} (0.15\text{mg/ml}) \times 1000\text{ml} \div \text{样本浓度} (\text{g/L})$$