

# 超氧阴离子清除能力检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1061

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、血液、药物

## 产品简介

超氧阴离子 ( $O_2^-$ ) 是通过将电子加到氧上而产生的一种短暂的自由基。它是由紫外线、香烟烟雾，环境污染物和  $\gamma$  辐射等环境因素作用形成的，或者是由黄嘌呤氧化酶或 NADPH 氧化酶等氧化酶衍生而来的。 $O_2^-$  一旦形成，就会攻击细胞成分并破坏脂质，蛋白质和 DNA。这会引发多种疾病，包括癌症，动脉粥样硬化，类风湿性关节炎，糖尿病，肝损害和中枢神经系统疾病。清除超氧阴离子自由基的研究越来越受到重视。本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于检测各种生物样本超氧阴离子清除能力。其原理是黄嘌呤氧化酶 (XO) 催化反应提供了超氧阴离子 ( $O_2^-$ )。 $O_2^-$  与 WST-8 染料反应形成水溶性的有色甲臜产物，可以很容易地进行比色定量。样品清除了  $O_2^-$ ，因此用于显色反应的  $O_2^-$  较少。通过比色法在 OD450nm 下测量样品的这种清除能力。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃
反应缓冲液	10mL	20mL	4℃
试剂一	300 $\mu$ L	600 $\mu$ L	4℃避光保存
试剂二	60 $\mu$ L	120 $\mu$ L	4℃避光保存
试剂三	60 $\mu$ L	120 $\mu$ L	-20℃
试剂四	300 $\mu$ L	600 $\mu$ L	-20℃

## 自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 450nm 处的吸光度）

96 孔板或微量玻璃比色皿、移液枪及枪头

恒温培养箱、制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：即用型；实验过程中，冰上避光放置；4℃避光保存。

试剂二：即用型；实验过程中，冰上避光放置；4℃避光保存。

试剂三：稀释前先摇匀；在洁净离心管中用提取液按照阳性对照和样本的需要量进行 20 倍稀释。实验过程中，冰上避光放置；分装-20℃保存。

试剂四：即用型；实验过程中，冰上放置；分装-20℃保存。试剂四可能看起来是浑浊的。移液前，先将试管涡旋。

## 产品说明书

工作液：对于 96 孔板，每孔准备 85 $\mu$ L 工作液，74 $\mu$ L 反应缓冲液，5 $\mu$ L 试剂四，5 $\mu$ L 试剂一和 1 $\mu$ L 试剂二，现配现用。

### 样本制备

1. 动物组织：预冷的 PBS 洗涤组织，称取 0.1g 组织加入 1mL 预冷的提取液匀浆组织，然后 12,000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。
2. 植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 预冷的提取液捣碎，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 12,000 g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。
3. 细胞样品：收集  $5 \times 10^6$  个细胞，用预冷的 PBS 洗涤细胞，离心并弃去上清液。将细胞重悬于 1mL 预冷的提取液中，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 12,000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。
4. 血液样本：使用标准规程收集血清或血浆（肝素，柠檬酸盐或 EDTA）。红细胞沉淀可以在 5 倍体积的冰冷去离子水中溶解；12,000g 离心 10min 以沉淀红细胞膜。在测定前，用提取液稀释血清/血浆（1:5），红细胞裂解液（1:100）。
5. 药物：用提取液稀释至一定浓度。例如 1mg/mL。

**注意：**推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80 $^{\circ}$ C 保存 1 个月。样品制备中应避免以下物质：抗坏血酸，叠氮化钠，> 0.2% SDS，> 1% NP-40 和 > 1% Tween-20。

### 实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 450nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入如下试剂：

试剂	空白 ( $\mu$ L)	对照 ( $\mu$ L)	测定 ( $\mu$ L)
样本	0	0	20
提取液	40	20	0
工作液	80	80	80
稀释后的试剂三	0	20	20

3. 混匀，立即读取 450nm 处的吸光度值  $A_0$ ，室温（25 $^{\circ}$ C）避光孵育 60min，再次读取 450nm 处的吸光度值  $A_{60}$ ，计算  $\Delta A = A_{60} - A_0$ ，分别记为  $\Delta A_{空}$ ， $\Delta A_{对}$ ， $\Delta A_{测}$ ，计算  $\Delta\Delta A_{对} = \Delta A_{对} - \Delta A_{空}$ ， $\Delta\Delta A_{测} = \Delta A_{测} - \Delta A_{空}$ ，空白孔和对照孔只需各做 1 次。

**注意：**1. 为了比较不同样品超氧阴离子清除能力，对于同一批样品必须稀释倍数相同，提取物或者药物配制成同样浓度。

2. 正式测定前务必选择 1-2 个样本做预实验，若出现  $\Delta\Delta A_{测}$  大于  $\Delta\Delta A_{对}$ ，可能是样本中干扰物的影响太大，可以将样本上清用提取液进一步稀释后再测。

### 结果计算

超氧阴离子清除率计算公式： $D\% = (\Delta\Delta A_{对} - \Delta\Delta A_{测}) \div \Delta\Delta A_{对} \times 100\%$

### 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：

PMK1049 超氧阴离子检测试剂盒（微量法）

PMK1051 总抗氧化能力（TAC）检测试剂盒（微量法）

PMK1052 羟自由基清除能力检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

