

超氧阴离子清除能力检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1061BKM

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/24S 96T/48S

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 γ 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臞产物，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
	48 T	96 T	
提取液	50mL	100mL	4℃
反应缓冲液	10mL	20mL	4℃
显色物	0.75mL	1.5mL	4℃避光保存
酶制剂	60 μ L	120 μ L	-20℃
底物	300 μ L	600 μ L	-20℃

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 450nm 处的吸光度）

恒温箱、制冰机、低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

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；使用前预冷；4℃保存。

反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

显色物：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；4℃避光保存。

酶制剂：使用时，用反应缓冲液进行 1:20 稀释，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；保存于-20℃。

底物：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装保存于-20℃。如果该组分出现浑浊，使用前请短暂涡旋。

工作液：临用前配制；每孔准备 85 μ L 工作液，现配现用，吸取 70 μ L 反应缓冲液，5 μ L 底物，10 μ L 显色物，混匀后待用。

样本制备

产品说明书

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℃ 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℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。
3. 细胞样品：收集 5×10^6 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℃ 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 倍体积的冰冷却离子水中溶解；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℃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. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 450nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 将工作液 25℃ 孵育 15min。
3. 操作表（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中操作）：

试剂（μL）	样本孔	样本对照孔	空白孔	空白对照孔
样本	20	20	0	0
工作液	80	80	80	80
稀释后的酶制剂	20	0	20	0
提取液	0	20	20	40

4. 混匀后，25℃ 避光孵育 30min 后，测定 450nm 处吸光度。计算 $\Delta A_{\text{样本}} = A_{\text{样本}} - A_{\text{样本对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}}$ 。

注意： 1. 空白孔和空白对照孔只需各做 1 孔；每个样本需要各设置一个样本对照孔。

2. 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。

3. 正式测定前务必选择 1-2 个样本做预实验，若出现 $\Delta A_{\text{样本}}$ 大于 $\Delta A_{\text{空白}}$ ，可能是样本中干扰物的影响太大，可将样本上清用提取液稀释 2-50 倍后再测，计算公式中乘以相应稀释倍数。

结果计算

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

注意：

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）

