

CheKine™ 超氧阴离子清除能力检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1080

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血液、药物
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是黄嘌呤氧化酶 (XO) 催化反应提供超氧阴离子 (O_2^-), O_2^- 与四唑盐 WST-8 染料反应形成水溶性的有色甲贖产物, 可以很容易地进行定量。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 450 nm 下测量样品的这种清除能力。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	70 mL	70 mL×2	4℃
Assay Buffer	10 mL	20 mL	4℃
Sample Diluent	10 mL	20 mL	4℃
WST-8	300 μ L	600 μ L	-20℃, 避光保存
Enhancer	60 μ L	120 μ L	-20℃, 避光保存
Xanthine Oxidase	7 μ L	14 μ L	-20℃, 避光保存
Xanthine	300 μ L	600 μ L	-20℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通酶标板
试剂	去离子水	用于处理样本
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Sample Diluent	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
WST-8	即用型	实验过程中冰上避光放置；-20℃ 避光保存
Enhancer	即用型	实验过程中冰上避光放置；-20℃ 避光保存
Working Xanthine Oxidase	稀释前先摇匀；在洁净离心管中用 Sample Diluent 按照阳性对照和样本的需要量进行 200 倍稀释。	实验过程中冰上避光放置；分装-20℃ 避光保存
Xanthine	即用型	实验过程中冰上放置；分装-20℃ 避光保存。Xanthine 可能看起来是浑浊的。移液前，先将试管涡旋

05-2 样本制备

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。所有样品都可以在 Extraction Buffer 中稀释。

- 动物组织样本：冰上预冷的 PBS 洗涤组织后，去除所有的红细胞，用 1 mL/0.1 g 的 Extraction Buffer 匀浆组织，12000 g，4℃ 离心 5 min，取上清液置冰上待测。

- **植物组织样本**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 预冷的 Extraction Buffer 捣碎，冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），12000 g，4℃离心 5 min，取上清液置冰上待测。
- **细胞（菌）**：收集 5×10^6 个细胞或细菌到离心管中，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1 mL 预冷的 Extraction Buffer，冰上孵育 10 min，然后 12000 g，4℃离心 5 min，取上清液置冰上待测。
- **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），直接检测。红细胞沉淀可以在 5 倍体积的冰去离子水中溶解，12000 g 离心 5 min 以沉淀红细胞膜，所得上清为红细胞裂解物。在超氧阴离子清除试验之前，用 Sample Diluent 稀释红细胞裂解物（1:100）。
- **药物**：稀释至一定浓度（如 1 mg/mL）进行测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。
2. **Working Reagent 配制**：每孔需要 80 μ L Working Reagent，为避免损失，按 85 μ L 每单孔体系配制：74 μ L Assay Buffer、5 μ L Xanthine、5 μ L WST-8 和 1 μ L Enhancer，现配现用。
3. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作。空白孔和对照孔只需做 1-2 次。

试剂	空白孔 (μ L)	对照孔 (μ L)	测定孔 (μ L)
Sample	0	0	20
Sample Diluent	40	20	0
Working Reagent	80	80	80
Working Xanthine Oxidase	0	20	20

4. **吸光度检测**：混匀，立即在 450 nm 处读取吸光度值 A_0 ，分别标记为 $A_{0 \text{ 空白}}$ 、 $A_{0 \text{ 对照}}$ 、 $A_{0 \text{ 测定}}$ 。室温（25℃）避光孵育 60 min，再次读取 450 nm 处的吸光度值 A_{60} 。分别标记为 $A_{60 \text{ 空白}}$ 、 $A_{60 \text{ 对照}}$ 、 $A_{60 \text{ 测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{空白}} = A_{60 \text{ 空白}} - A_{0 \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{\text{对照}} = A_{60 \text{ 对照}} - A_{0 \text{ 对照}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{60 \text{ 测定}} - A_{0 \text{ 测定}}$ ， $\Delta\Delta A_{\text{对照}} = \Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ， $\Delta\Delta A_{\text{测定}} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。

2. 样本超氧阴离子清除率计算

超氧阴离子清除率 $D\% = (\Delta\Delta A_{\text{对照}} - \Delta\Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta\Delta A_{\text{对照}} \times 100\%$

07 结果展示

示例-1: 取 0.1 g 小鼠肝脏组织，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{空白}} = A_{60 \text{ 空白}} - A_{0 \text{ 空白}} = 0.064 - 0.056 = 0.008$ ， $\Delta A_{\text{对照}} = A_{60 \text{ 对照}} - A_{0 \text{ 对照}} = 0.508 - 0.087 = 0.421$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{60 \text{ 测定}} - A_{0 \text{ 测定}} = 0.824 - 0.731 = 0.093$ ， $\Delta\Delta A_{\text{对照}} = \Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.421 - 0.008 = 0.414$ ， $\Delta\Delta A_{\text{测定}} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.093 - 0.008 = 0.085$ ，计算超氧阴离子清除率 $D\% = (\Delta\Delta A_{\text{对照}} - \Delta\Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta\Delta A_{\text{对照}} \times 100\% = (0.414 - 0.085) \div 0.414 \times 100\% = 79.47\%$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？
如果 $\Delta\Delta A_{\text{测定}} > \Delta\Delta A_{\text{对照}}$ ，样本可用 Extraction Buffer 或 Sample Diluent 进一步稀释或减少提取用样本量，再重新进行测定。如果 $\Delta\Delta A_{\text{测定}} < 0.02$ ，可提高样本量，再重新进行测定。

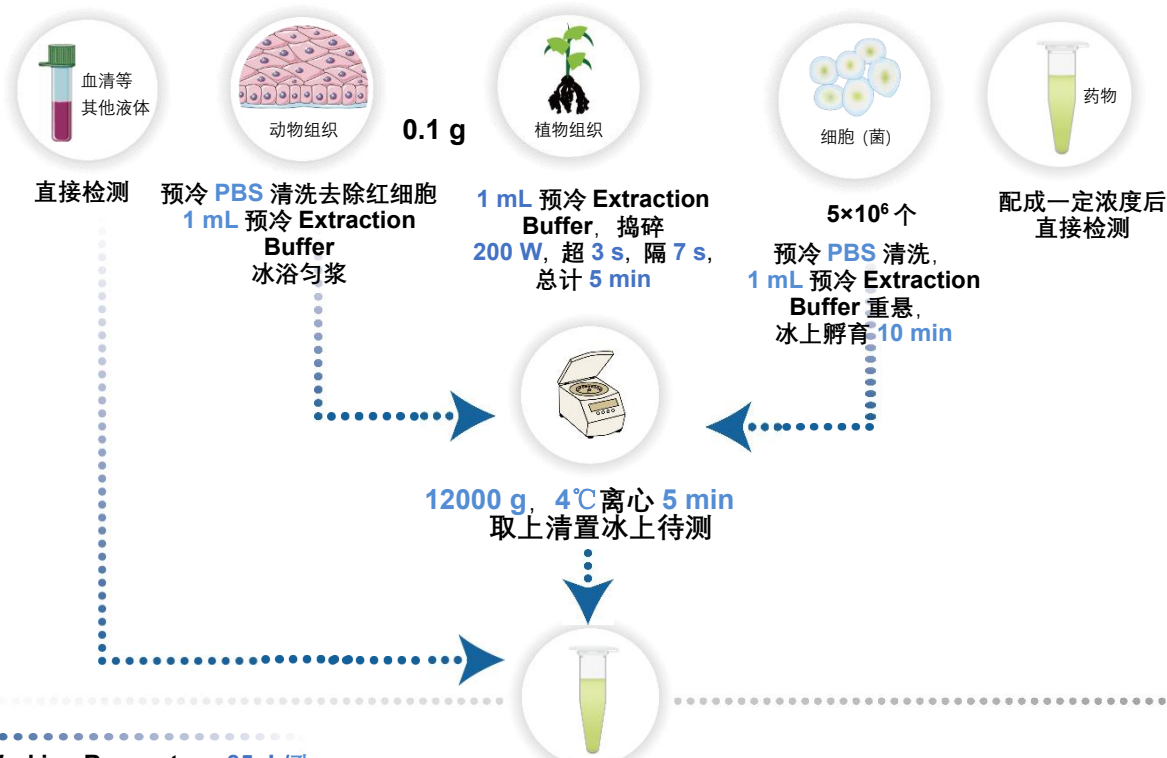
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1500	CheKine™ 总抗氧化能力（TAC）检测试剂盒（微量法）
KTB1210	CheKine™ 超氧阴离子含量检测试剂盒（微量法）

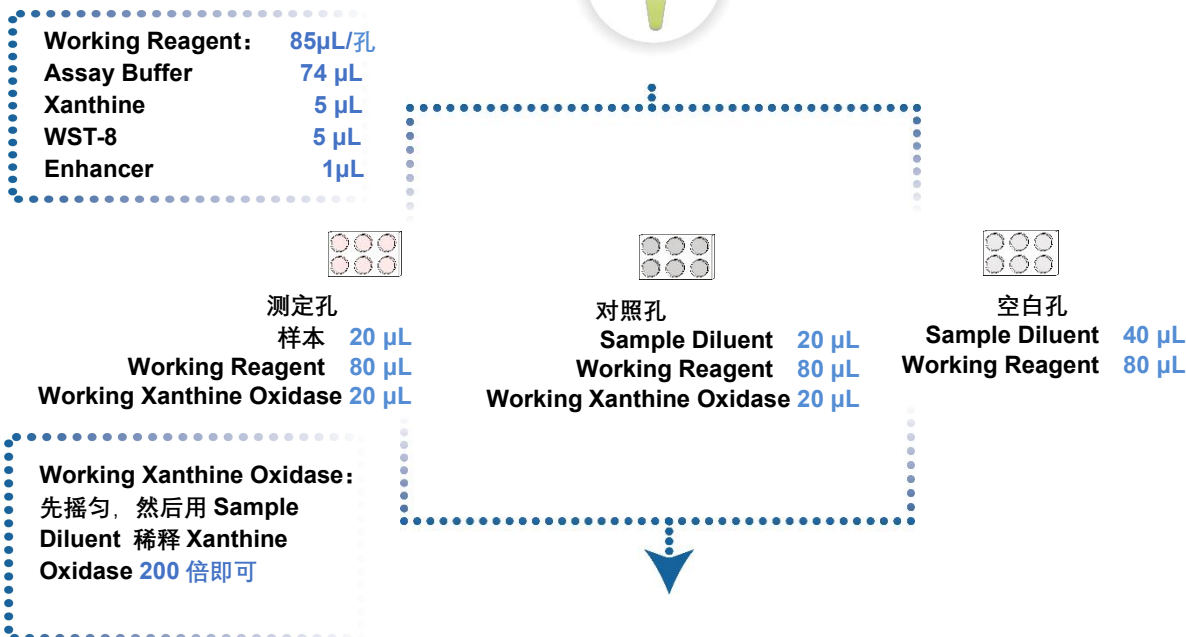
CheKine™ 超氧阴离子清除能力检测流程示意图

(Abbkine 货号: KTB1080)

样本处理



体系配置



混匀, 立即读取室温 450 nm 处的吸光度值 A_0

数据检测

