

CheKine™ 超氧阴离子含量检测试剂盒（微量法）

货号：KTB1210

规格：48 T/48 S

96 T/96 S

批号：见产品标签

	检测范围：0.001-0.2 μmol/mL		灵敏度：0.001 μmol/mL
	适用样本：动植物组织、细胞、真菌、细菌、血清（浆）		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

超氧阴离子等活性氧在生物体内具有免疫和信号传导的作用，但积累过多会对细胞膜及生物大分子产生破坏作用，导致机体细胞和组织代谢异常，从而引起多种疾病。

本试剂盒检测原理是超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- ， NO_2^- 与格里斯试剂反应，生成红色的偶氮化合物，测定其在 540 nm 处的吸光度值即可计算样本中超氧阴离子的含量。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	80 mL	80 mL×2	4℃
Reagent I	6 mL	12 mL	4℃
Reagent II	9 mL	18 mL	4℃，避光保存
Reagent III	9 mL	18 mL	4℃，避光保存
NaNO ₂ Standard (10 mmol/L)	0.5 mL	0.5 mL	4℃

*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 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS/三氯甲烷	清洗样本用/检测体系配制用
其他	匀浆器（组织样本）、水浴锅、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。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 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）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 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

05-1-1 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
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存；有刺激气味，注意防护
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；有毒性，注意防护
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
NaNO ₂ Standard (10 mmol/L)	即用型；使用前平衡到室温	10 mM；4℃保存

05-1-2 标准品配制

按下表所示，用 Extraction Buffer 稀释 Standard，以 Extraction Buffer 作为空白。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品 (μL)	Extraction Buffer (μL)	浓度 (μM)
1	20 μL 10 mM	980	200
2	200 μL 200 μM	200	100
3	200 μL 100 μM	200	50
4	200 μL 50 μM	200	25
5	200 μL 25 μM	200	12.5
6	200 μL 12.5 μM	200	6.25
7	200 μL 6.25 μM	200	3.125
空白	0	200	0

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。

- **动物组织**：称取 0.1 g 样本加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆。4℃，10000 g 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- **植物组织**：称取 0.1 g 样本加入 1 mL 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）。4℃，10000 g 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- **细胞、细菌或真菌**：收集 5×10^6 个细胞、细菌或真菌，用预冷的 PBS 清洗 1 次，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s）。4℃，10000 g 离心 10 min 后，取上清置冰上待测。
- **血清（浆）**：直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
2. **检测体系配制**：在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	空白管 (μL)	标准管 (μL)
样本	40	40	0	0
不同浓度的 Standard	0	0	0	40
Extraction Buffer	60	140	100	60
Reagent I	80	0	80	80
充分混匀，37℃孵育 20 min				
Reagent II	60	60	60	60
Reagent III	60	60	60	60
充分混匀，37℃孵育 20 min				
三氯甲烷	100	100	100	100

3. 吸光度检测：混匀，8000 g，25℃离心 5 min，分别从每个反应管中小心吸取上层水相 200 μL 上清于 96 孔板中，在 540 nm 处读取吸光度值，分别记为 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 和 $A_{\text{标准}}$ 。

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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 y 值 (μmol/L)。

3. 样本超氧阴离子含量计算

● 按样本质量计算

超氧阴离子 (μmol/g) = $2 \times y \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) \times 10^{-3} \times n = 0.002y \div W \times n$

超氧阴离子产生速率 (μmol/min/g) = $2 \times y \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T \times 10^{-3} \times n = 0.0001y \div W \times n$

● 按细胞、细菌或真菌数量计算

超氧阴离子 (μmol/min/10⁴) = $2 \times y \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \times 10^{-3} \times n = 0.000004y \times n$

超氧阴离子产生速率 (μmol/min/10⁴) = $2 \times y \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T \times 10^{-3} \times n = 0.0000002y \times n$

● 按液体体积计算

超氧阴离子 (μmol/mL) = $2 \times y \times 10^{-3} \times n = 0.002y \times n$

超氧阴离子产生速率 (μmol/min/mL) = $2 \times y \div T \times 10^{-3} \times n = 0.0001y \times n$

● 按蛋白浓度计算

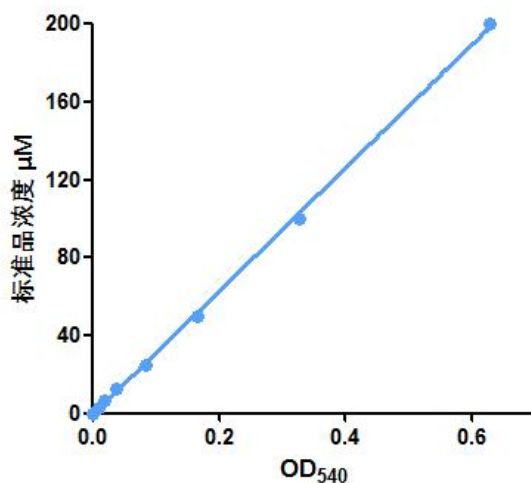
超氧阴离子 (μmol/mg prot) = $2 \times y \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3} \times n = 0.002y \div C_{\text{pr}} \times n$

超氧阴离子产生速率 (μmol/min/mg prot) = $2 \times y \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10^{-3} \times n = 0.0001y \div C_{\text{pr}} \times n$

$V_{\text{样本}}$ ：参与反应样本体积，0.04 mL； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，20 min； $V_{\text{提取}}$ ：提取过程中加入的提取液体积，1 mL；W：样本鲜重，g；10⁻³：1 mL=10⁻³ L。500：细胞、细菌或真菌数量，5×10⁶，以 10⁴ 为单位；2：2 分子 O₂⁻ 参与反应生成 1 分子 NO₂⁻，n：样本稀释倍数。

07 结果展示

典型标准曲线： $y=316.95x-0.6274$ ， $R^2=0.9994$



示例-1: 取 0.1 g 小鼠肝脏, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.094 - 0.069 = 0.025$, 代入标准曲线, 计算 $y=7.29$ 。按样本质量计算得: 超氧阴离子含量($\mu\text{mol/g}$)= $0.002y \div W \times n = 0.146 \mu\text{mol/g}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办?

如果样本 $\Delta A_{\text{测定}} > 1.0$, 样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释, 计算结果乘以稀释倍数或减少提取用样本量。

如果 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.005$ 可适当加大样本量。

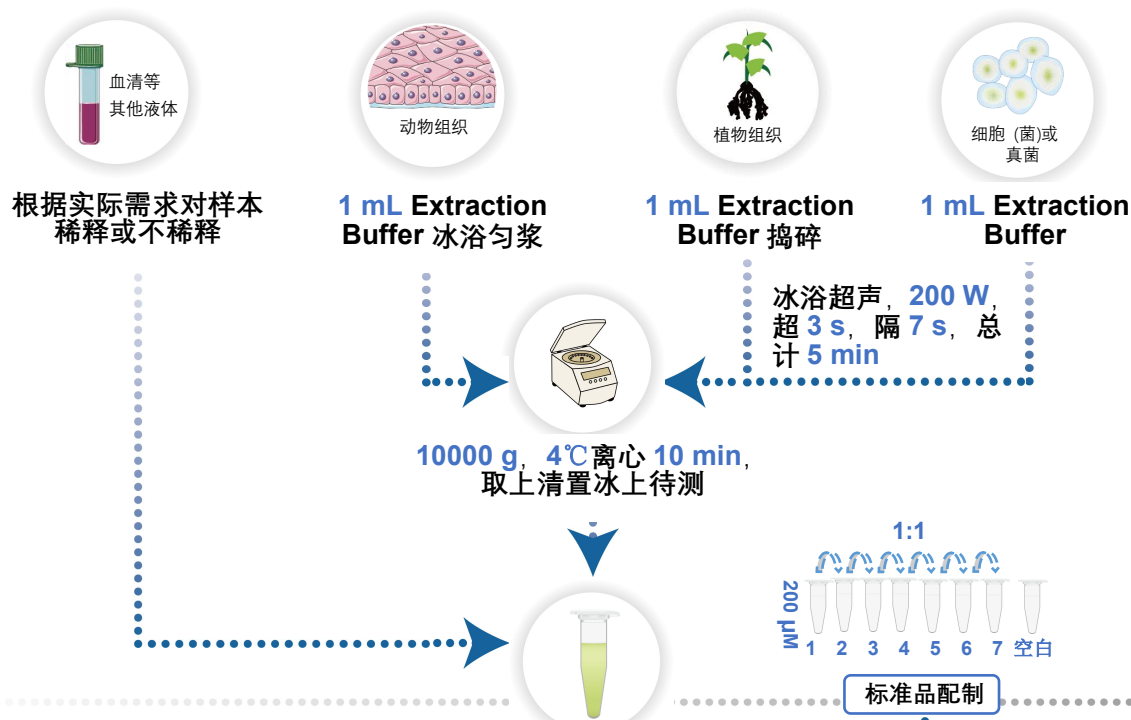
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1050	CheKine™ 脂质过氧化 (丙二醛) 分析试剂盒 (微量法)
KTB1041	CheKine™ 过氧化氢 (H ₂ O ₂) 检测试剂盒 (微量法)
KTB1310	CheKine™ 葡萄糖氧化酶活性 (GOD) 检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ 超氧阴离子含量检测流程示意图

(Abbkine 货号: KTB1210)

样本处理



体系配置



数据检测

混匀，37℃ 水浴 20 min
每管加入 60 μL Reagent II 和 60 μL Reagent III

混匀，37℃ 水浴 20 min
每管加入 100 μL 三氯甲烷，混匀
8000 g，25℃ 离心 5 min
小心吸取上层水相 200 μL 上清于 96 孔板中

测定 540 nm 吸光度
结果计算