

## 超氧化物检测试剂盒 E2001

**描述:** 超氧化物检测试剂盒 (Superoxide Assay Kit) 是一种用于超氧化物快速高灵敏检测的试剂盒。超氧化物通常指超氧阴离子 (superoxide anion), 是一种氧分子的自由基, 在细胞内主要有 NADPH 氧化酶把电子传递给氧分子产生。超氧阴离子是一种强氧化剂, 主要由中性粒细胞、巨噬细胞为代表的免疫细胞, 在各种应激条件下产生, 从而抵御微生物的感染。在病理条件下, 过度产生的超氧阴离子, 也会导致机体损伤和引发各种疾病。

**原理:** 本试剂盒利用超氧化物可以还原 WST-1 产生可溶性有色物质为基础来检测超氧化物。试剂盒的检测试剂中添加了过氧化氢酶 (Catalase) 等, 可以清除过氧化氢等过氧化物对 WST-1 显色的干扰, 使测定结果更加准确。另外本试剂盒还提供了超氧化物歧化酶 (SOD), 可以验证本试剂盒检测的是否为超氧化物, 以排除检测体系中其它可能存在的干扰。对于本试剂盒, 加入 SOD 通常可以抑制 90% 以上的超氧化物。

**适用范围:**

**试剂盒组成:**

- (1) 超氧化物检测缓冲液 50 ml/瓶                      (2) WST-1 溶液 1 ml/管  
(3) Catalase 溶液 200  $\mu$ l/管                      (4) SOD 溶液 50  $\mu$ l/管

**储存条件:** -20 $^{\circ}$ C 储存, 一年有效

**所需设备:** 酶标仪, 最佳波长 450nm

**操作步骤:**

1. 超氧化物检测工作液的配制:

根据测定样本数量按下表所示比例配制超氧化物检测工作液。

|             | 1 个样品       | 10 个样品      | 50 个样品      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 超氧化物检测缓冲液   | 200 $\mu$ l | 2 ml        | 10 ml       |
| WST-1 溶液    | 10 $\mu$ l  | 100 $\mu$ l | 500 $\mu$ l |
| Catalase 溶液 | 2 $\mu$ l   | 20 $\mu$ l  | 100 $\mu$ l |

2. 细胞接种和孵育: 取需要测定的细胞, 如果是**悬浮细胞**, 利用 PBS 洗涤一次, 再利用超氧化物检测缓冲液重悬细胞, 调整到合适浓度后, 接种 100  $\mu$ l 到 96 孔板中 (细胞数量请通过预实验优化); 如果是**贴壁细胞**, 提前一天接种到 96 孔板中, 24 小时后吸去培养基, 利用 PBS 洗涤一次, 再加入 100  $\mu$ l 超氧化物检测缓冲液。然后加入相应的超氧化物检测工作液配制的药物及超氧化物刺激剂 (如 PMA 等), 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1 小时或经过优化的时间。

具体检测对照设置如下表所示:

|           | 空白对照        | 样品对照        | 样品          |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 细胞        | +           | +           | +           |
| 超氧化物检测工作液 | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l |
| 刺激物       | —           | +           | +           |
| SOD 溶液    | —           | 1 $\mu$ l   | —           |

3. 孵育结束后，利用酶标仪测定  $A_{450nm}$ 。如果样品吸光度过高，可适当降低接种细胞数量或缩短孵育时间后测定，如果样品吸光度过低，可适当增加接种细胞数量或延长孵育时间后测定。

#### 4、数据处理：

利用未加干预因素处理的样品和加了干预因素处理的样品吸光度减去空白对照吸光度后，计算干预因素对超氧化物产生的上调或下调比例。

#### 注意事项

1. WST-1 溶液、Catalase 溶液和 SOD 溶液请尽量避免反复冻融，可以适当分装。
2. 初次使用试剂盒时，小体积液体试剂请适当离心后使用。
3. 初次测定超氧化物，可取小鼠骨髓细胞，500000 细胞/孔接种到 96 孔板中，利用 50ng/mlPMA 刺激 1 小时，检测超氧化物作为阳性对照。
4. 本产品仅限专业人员用于科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。