

## 超氧化物检测试剂盒 (DHE)

### Superoxide Assay Kit (DHE)

产品编号	产品名称	规格
BN27103	Superoxide Assay Kit (DHE)	100T

#### 产品简介

超氧化物检测试剂盒 (Superoxide Assay Kit) 是一种用于细胞内超氧化物检测的试剂盒。超氧化物通常指超氧阴离子 (Superoxide anion), 是一种氧分子的自由基, 在细胞内主要由 NADPH 氧化酶和黄嘌呤氧化酶催化产生。超氧阴离子是一种强氧化剂, 主要由中性粒细胞、巨噬细胞、单核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。

Dihydroethidium (DHE) 是用于超氧化物检测的荧光探针, 可通过自由扩散进入细胞, 并与细胞内超氧化物反应脱氢生成溴化乙锭。溴化乙锭可以和核酸结合然后发射红色荧光, 可以用于细胞内超氧化物的检测。从而用于病理生理研究或药物筛选。本试剂盒利用能够刺激中性粒细胞产生超氧化物的佛波酯

(Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) 为阳性对照。

#### 试剂组成

组份编号	组份名称	规格	数量
BN27103 -1	DHE (2 mM)	100 $\mu$ l/管	1
BN27103 -2	PMA (50 $\mu$ g/ml)	50 $\mu$ l/管	1
—	说明书	份	1

#### 需要而未提供的试剂及器材

1. 细胞
2. 细胞培养用 PBS
3. 系列可调节量程移液器及吸头
4. 干净的试管、离心管及 24 孔板
5. 流式细胞仪

#### 储存条件

-20 $^{\circ}$ C 储存, 保质期 12 个月。

#### 注意事项

1. DHE 溶液请尽量避免反复冻融, 可以适当分装。
2. 初次使用试剂时, 请适当离心后使用。

- 初次测定超氧化物，可取小鼠骨髓细胞， $1.0 \times 10^6$  细胞/孔，接种到 24 孔板中，加入终浓度  $2 \mu\text{M}$  的 DHE，然后利用终浓度  $50 \text{ ng/ml}$  PMA 刺激 1 小时，检测超氧化物作为阳性对照。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

- 细胞接种及处理：取需要测定的细胞，利用培养基调整到合适浓度后，接种到 24 孔板中。如果是贴壁细胞，提前一天接种到 24 孔板中，24 小时更换新鲜培养基。然后加入 DHE 探针(利用培养基稀释)至终浓度  $2 \mu\text{M}$ ， $37^\circ\text{C}$  孵育 15min，然后加入超氧化物产生的刺激剂， $37^\circ\text{C}$  孵育一定时间。如果是评价药物活性，可以在加入刺激剂前后加入药物共同孵育。

具体检测体系设置如下表所示：

	对照组	刺激组
细胞	+	+
DHE	+	+
刺激剂	-	+

- 孵育结束后，收集细胞， $4^\circ\text{C}$ ， $300\text{g}$  离心 5 分钟，弃上清；然后加入 1 ml 细胞培养用 PBS，再次  $4^\circ\text{C}$ ， $300\text{g}$  离心 5 分钟；0.5 ml PBS 重悬细胞，进行流式细胞测定（碘化丙啶（PI）通道）。

## 数据处理

利用 FlowJo 软件处理流式细胞检测源数据，对各组样品细胞荧光分布作图或统计各组样品细胞平均荧光强度。如下图所示：

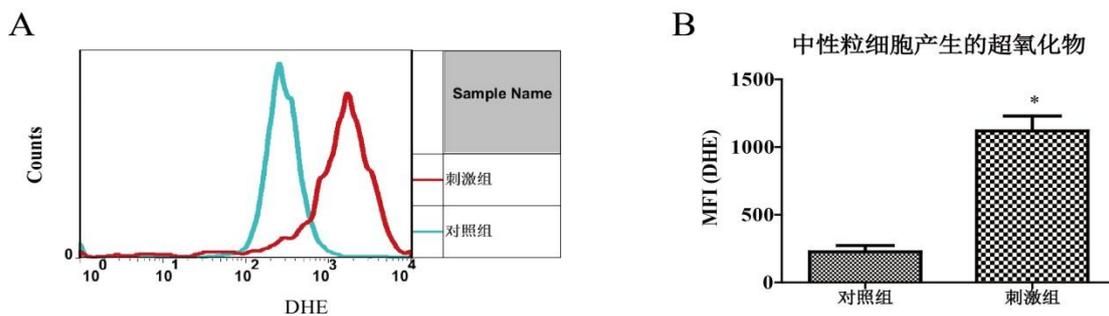


图 1: DHE 检测中性粒细胞产生的超氧化物。取 Balb/c 小鼠骨髓细胞，接种到 24 孔板中，加入 DHE 探针后，加入 PMA 刺激 1 小时，然后收集细胞进行流式测定，分析中性粒细胞超氧化物的产生。\*  $P < 0.05$  vs 对照组。

## 参考文献

- Tkalcevic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J.P., Segal, A.W., Roes, J., 2000. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity*, 12: 201-210.