

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K001-M

产品规格: 48T (20 samples)/ 96 T(44 samples)

检测仪器: 酶标仪 (440-460 nm)

**Elabscience®抑制与产生超氧阴离子自由基
比色法测试盒(WST-1 法)**

**Inhibition And Production Of Superoxide Anionic
Colorimetric Assay Kit (WST-1 Method)**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、尿液、细胞及细胞上清、各种动植物组织等样本中的抑制超氧阴离子自由基活力或白细胞，药物样本的产生超氧阴离子自由基活力。

检测原理

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基，WST-1（一种水溶性四唑盐）可以与产生的超氧化物阴离子反应产生水溶性的甲臌染料，当被测样本中含有超氧阴离子自由基抑制剂时，可抑制甲臌染料的形成，当被测样本中含有产生超氧阴离子自由基物质时，促进甲臌染料的形成，通过对WST-1产物的比色分析可计算出样本抑制与产生超氧阴离子活力单位。

本试剂盒检测组织及细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用BCA法（货号：E-BC-K318-M）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物贮备液 (Substrate Solution)	0.07 mL×1 支	0.14 mL×1 支	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶贮备液 (Enzyme Stock Solution)	0.15 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	VC 标准品 (VC Standard)	粉剂×3 支	粉剂×3 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同试剂盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（440-460 nm，最佳检测波长 450 nm）、涡旋混匀仪、微量移液器（1000 μ L，200 μ L，100 μ L，10 μ L）、多道移液器（300 μ L）、37 $^{\circ}$ C 恒温箱

耗材：枪头（1000 μ L，200 μ L，10 μ L）、EP 管（10 mL，2 mL）

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）

试剂准备

① 试剂三从-20 $^{\circ}$ C取出，放在冰上缓慢融化（最好分装，避免反复冻融），其它试剂平衡至室温。

② 酶工作液的配制：

冰盒上配制，按试剂三：试剂四为1: 10的体积比混匀，可2-8 $^{\circ}$ C保存3天。

③ 底物应用液的配制：

按试剂二：试剂一为1: 200的体积比混匀，可2-8 $^{\circ}$ C保存7天。

④ 0.05 mg/mL标准品的配制：

取一支试剂五用1 mL双蒸水溶解，浓度为5 mg/mL，然后用双蒸水稀释100倍，即为0.05 mg/mL标准品。由于标准品易氧化，请在30 min内进行实验。

样本准备

① 样本处理

样本要求：样本中不能含有 SDS、Tween20、NP-40、Triton X-100 等去污剂，不能含有 DTT、2-巯基乙醇等还原性试剂。

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：常规匀浆处理(匀浆介质为 PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl))。匀浆后，4°C，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取 10⁶ 细胞加入 300-500 μL PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl) 进行匀浆。匀浆后，4°C，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本抑制率的计算

本试剂盒可检测样本的抑制率范围在 30%-65% 之间，最佳抑制率范围 40 %-60 %，其对应的浓度为最佳取样浓度。

抑制率计算公式：

$$\text{抑制率} (\%) = \frac{(A_1 - A_2) - (A_5 - A_6)}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

③ 样本的稀释

在正式检测前，需选择差异较大的2-3个样本稀释成不同浓度进行预实验，选取在最佳抑制率范围之间的稀释倍数，进行正式批量实验。不同样本稀释比例范围如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	4-7 倍	10% 大鼠脑组织	150-200 倍
小鼠血清	15-25 倍	10% 大鼠肝组织	500-600 倍
大鼠血清	25-35 倍	10% 小鼠肝组织	500-600 倍
人唾液	不稀释	10% 小鼠心组织	150-200 倍
HepG2 细胞上清	不稀释	10% 绿萝组织	20-30 倍

注：稀释液为生理盐水或 PBS (0.01 M, pH 7.4) 。

若样本抑制率大于 65%，需将样本稀释或减少取样量后再测试；若抑制率小于 30%，需减少样本稀释倍数或增加取样量后再测试。

实验关键点

- ① 测 OD 值时，酶标板孔中不能有气泡。
- ② 底物应用液加入后立即有超氧化物生成，请用多道移液器加底物应用液以缩短时间，减少各孔间的误差。
- ③ 标准品易氧化，请现配现用。

操作步骤

- ① 对照孔：加 20 μL 双蒸水、20 μL 酶工作液；
对照空白孔：加 20 μL 双蒸水、20 μL 试剂四；
标准孔：加 20 μL 0.05 mg/mL 标准品、20 μL 酶工作液
标准空白孔：加 20 μL 0.05 mg/mL 标准品、20 μL 试剂四；
测定孔：加 20 μL 待测样本、20 μL 酶工作液；
测定空白孔：加 20 μL 待测样本、20 μL 试剂四。
- ② 向步骤①中的各孔加 200 μL 底物应用液，混匀。
- ③ 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，酶标仪 450 nm 测 OD 值。

注：试剂触酶标板底加入，千万要换枪头；加样要慢，避免产生气泡。

(气泡影响测定结果)

操作表

	对照孔	对照空白孔	标准孔	标准空白孔	测定孔	测定空白孔
待测样本(μL)	--	--	--	--	20	20
标准品(μL)	--	--	20	20	--	--
双蒸水(μL)	20	20	--	--	--	--
酶工作液(μL)	20	--	20	--	20	--
试剂四(μL)	--	20	--	20	--	20
底物应用液 (μL)	200	200	200	200	200	200

混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，酶标仪 450 nm 测 OD 值。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

样本抑制超氧阴离子活力单位的计算：

血清（浆）、细胞培养液样本：

定义：在反应系统中，每升血清（浆）在 37℃ 反应 20 min 所抑制的超氧阴离子相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位（U/L）。

$$\text{抑制超氧阴离子活力单位 (U/L)} = \frac{(A_1 - A_2) - (A_5 - A_6)}{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)} \times C \times 1000 \times f$$

动、植物组织，细胞样本：

定义：在反应系统中，每克组织/细胞蛋白在 37℃ 反应 20 min 所抑制的超氧阴离子相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位（U/gprot）。

$$\text{抑制超氧阴离子活力单位 (U/gprot)} = \frac{(A_1 - A_2) - (A_5 - A_6)}{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)} \times C \times 1000 \div C_{pr} \times f$$

样本产生超氧阴离子活力单位的计算：

液体样本的计算公式：

定义：在反应系统中每升物质在 37℃ 反应 20 min 所产生的超氧阴离子相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。

$$\text{产生超氧阴离子活力单位 (U/L)} = \frac{(A_5 - A_6) - (A_1 - A_2)}{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)} \times C \times 1000 \times f$$

固体样本：

定义：在反应系统中每克物质在 37℃ 反应 20 min 所产生的超氧阴离子相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。

$$\text{产生超氧阴离子活力单位 (U/g)} = \frac{(A_5 - A_6) - (A_1 - A_2)}{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)} \times C \div C_1 \times f$$

注解:

A₁: 对照孔 OD 值

A₂: 对照空白孔 OD 值

A₃: 标准孔 OD 值

A₄: 标准空白孔 OD 值

A₅: 测定孔 OD 值

A₆: 测定空白孔 OD 值

C: 标准品浓度 (0.05 mg/mL)

1000: 单位换算 1 L=1000 mL

C_{pr}: 待测样本蛋白浓度 (gprot/L)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C₁: 样本浓度 (g/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

平均批间差	5.8 %	平均批内差	2.0 %
平均回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

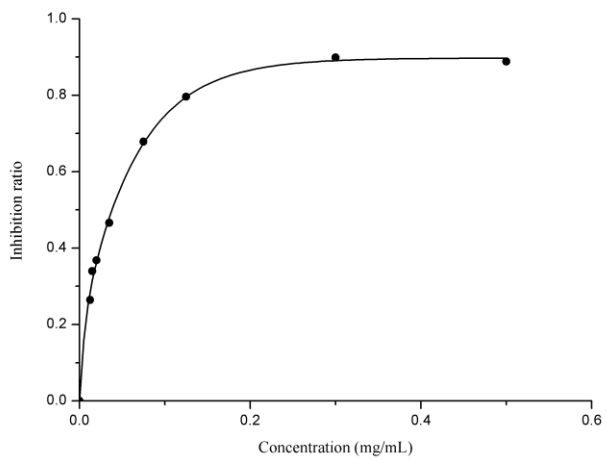
① 标准品稀释：取一支标准品，加5 mL双蒸水溶解，配成1 mg/L标准品

浓度 (mg/mL)	0	0.0125	0.015	0.035	0.075	0.125	0.3	0.5
1 mg/mL Vc (μL)	0	12.5	15	35	75	125	300	500
双蒸水(μL)	1000	987.5	985	965	925	875	700	500

②标准品加样量20 μL，按照说明书操作步骤进行操作，读取数据：

浓度 (mg/mL)	0	0.0125	0.015	0.035	0.075	0.125	0.3	0.5
标准管 OD 值	0.567	0.411	0.386	0.311	0.218	0.167	0.202	0.310
	0.541	0.426	0.376	0.324	0.214	0.172	0.197	0.308
标准空白管 OD 值	0.039	0.039	0.041	0.042	0.052	0.064	0.150	0.252
	0.039	0.040	0.041	0.043	0.049	0.065	0.145	0.251
标准管平均 OD 值	0.554	0.419	0.381	0.318	0.216	0.170	0.200	0.309
标准空白管平均 OD 值	0.039	0.040	0.041	0.043	0.051	0.065	0.148	0.252
绝对 OD 值	0.515	0.379	0.340	0.275	0.166	0.105	0.052	0.058
抑制率	0	26%	34%	47%	68%	80%	90%	89%

②绘制标曲(如下图):



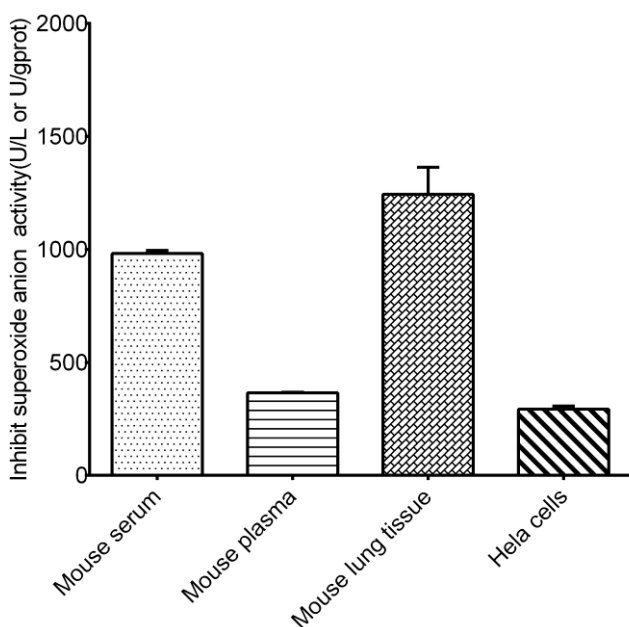
附录2 实例分析

例如检测小鼠肺组织(数据仅供参考):

取制备好的10%小鼠肺组织,用生理盐水(0.9% NaCl)稀释200倍,取20 μL 稀释后样本按操作表操作,结果如下:对照孔平均OD值为0.588,对照空白孔平均OD值0.045,标准孔平均OD值为0.313,标准空白孔平均OD值0.043,测定孔平均OD值为0.344,测定空白孔平均OD值0.040,同时测得10%小鼠肺匀浆蛋白含量7.04 gprot/L,则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{抑制超氧阴离子活力} &= \frac{(0.588 - 0.045) - (0.344 - 0.040)}{(0.588 - 0.045) - (0.313 - 0.043)} \\ & \quad (\text{U/gprot}) \\ & \times 0.05 \times 1000 \times 200 \div 7.04 = 1243.5 \text{ U/gprot} \end{aligned}$$

按照说明书操作,测定小鼠血清(稀释20倍,加样量30 μL)、小鼠血浆(稀释8倍,加样量20 μL)、小鼠肺组织(10%组织匀浆的蛋白含量7.04 gprot/L,稀释200倍,加样量20 μL)、Hela细胞(蛋白含量5.59 gprot/L,稀释30倍,加样量20 μL)中抑制超氧阴离子活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值复孔差异大	微量移液器使用不熟练	小心加样,避免液体溅到其它测样管中
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
抑制率不在 30%-65%	样本稀释倍数不合理	选择预实验结果,抑制率在40%-60%的稀释倍数进行正式实验
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。