

(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-K802-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(580-590 nm)

Elabscience®总氧化状态(TOS)比色法测试盒

Total Oxidant Status (TOS) Colorimetric Assay Kit

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细胞、组织样本及血清等液体样本中的总氧化状态。

检测原理

在酸性条件下，样本中的氧化性物质可将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ，后者与二甲酚橙高度结合产生一种蓝紫色的复合物。在溶液 pH 为 2-3 的范围内时，其最大吸收波长在 590 nm 附近，且颜色深浅程度在一定浓度、一定时间内与氧化性物质的含量成正比，从而间接测定样本的总氧化状态。

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

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)	显色剂 (Chromogenic Agent)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	200 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢 标准品(200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 Standard)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	2-8°C避光 保存 3 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，不同测试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(580-590 nm, 最佳检测波长 590 nm)

试剂准备

- ① 检测前，试剂平衡至室温。
- ② 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	40	50	60	80	100
200 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	10	20	40	50	60	80	100
双蒸水(μL)	200	190	180	160	150	140	120	100

样本准备

① 样本处理

血清样本：可直接测定。

组织或细胞样本：组织样本处理的匀浆介质为 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 或生理盐水(0.9% NaCl)。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：2.5-100 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%大鼠脾组织	不稀释
猪血清	不稀释	10%大鼠肝组织	不稀释
马血清	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
食蟹猴血清	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释
0.612×10^6 Molt-4 细胞	不稀释		

注：稀释液为 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)或生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

- ① 试剂一易受污染，建议实验前分装入 EP 管中取用。
- ② 试剂二取用后及时密封，不可长时间暴露于空气中。
- ③ 建议测定孔控制在 30 个以内。

操作步骤

- ① 测定孔：向酶标板对应的测定孔中加入 20 μL 的待测样本。
标准孔：向酶标板对应的标准孔中加入 20 μL 不同浓度的标准品。
- ② 向步骤①各孔中加入 200 μL 的试剂一。
- ③ 酶标板上振板 5 s，于波长 590 nm 处测定各孔 OD 值，记为 A_1 。
- ④ 再向酶标板各孔中加入 50 μL 的试剂二。
- ⑤ 酶标仪上振板 5 s，37°C 恒温箱孵育 5 min，于波长 590 nm 处再次测定各孔 OD 值，记为 A_2 ，则 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

操作表

	测定孔	标准孔
待测样本(μL)	20	--
不同浓度标准品(μL)	--	20
试剂一(μL)	200	200
酶标板上振板 5 s，于波长 590 nm 处测定各孔 OD 值，记为 A_1		
试剂二(μL)	50	50
酶标仪上振板 5 s，37°C 恒温箱孵育 5 min，于波长 590 nm 处再次测定各孔 OD 值，记为 A_2 ，则 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清等液体样本总氧化状态的计算公式:

$$\text{TOS} \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L)} = (\Delta A_{590} - b) \div a \times f$$

组织或细胞样本总氧化状态的计算公式:

$$\text{TOS} \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./gprot)} = (\Delta A_{590} - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解:

y: 标准品 ΔA 值-空白孔 ΔA 值(标准品浓度为0的 ΔA 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{590} : 样本的绝对 ΔA 值(样本的 ΔA 值-标准品浓度为0时的 ΔA 值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 组织或细胞样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

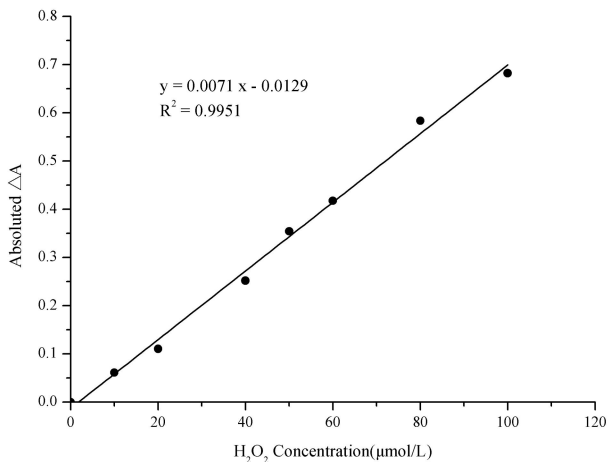
检测范围	2.5-100 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	平均批间差	3.5 %
灵敏度	2.5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	平均批内差	2.3 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度的过氧化氢标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，读取各点OD并计算平均 ΔA 值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	40	50	60	80	100
A_1	0.040	0.039	0.040	0.041	0.039	0.039	0.039	0.040
	0.039	0.039	0.039	0.040	0.039	0.040	0.040	0.041
A_2	0.126	0.185	0.238	0.377	0.473	0.537	0.700	0.830
	0.123	0.184	0.230	0.377	0.483	0.547	0.716	0.785
ΔA	0.086	0.146	0.199	0.336	0.435	0.498	0.661	0.790
	0.084	0.146	0.191	0.337	0.444	0.507	0.676	0.744
平均 ΔA 值	0.085	0.146	0.195	0.337	0.439	0.502	0.668	0.767
绝对 ΔA 值	0.000	0.061	0.110	0.252	0.354	0.417	0.584	0.682

② 绘制标曲(如下图)：



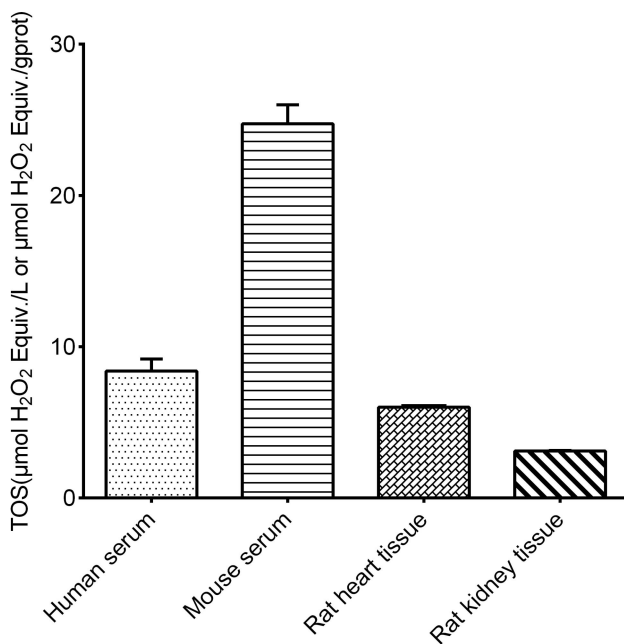
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

例如检测人血清(数据仅供参考): 取20 μL 人血清加入到酶标板相应的测定孔中,按操作表检测,结果如下:总氧化状态的标准曲线: $y = 0.007x - 0.0146$,测定孔 ΔA 值为0.142,空白孔 ΔA 值为0.098,则样本的绝对 ΔA 值为: $0.142 - 0.098 = 0.044$ 。计算结果为:

$$\text{TOS} \left(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{Equiv./L} \right) = (0.044 + 0.0146) \div 0.007 = 8.37 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{Equiv./L}$$

按说明书,测定人血清(加样量20 μL)、小鼠血清(加样量20 μL)、大鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度为8.42 gprot/L ,加样量20 μL)和大鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为11.71 gprot/L ,加样量20 μL)的总氧化状态(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
空白孔显色，OD 值超过 0.2	试剂二受到了污染	试剂二取用后务必密封保存
标准孔和测定孔颜色有差异	样本本身带有一定干扰物质	正常现象，不影响测定结果

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。

附录4 客户发表文献

1. Guler A , Yilmaz A , Oncer N ,et al.Machine learning-assisted SERS approach enables the biochemical discrimination in Bcl-2 and Mcl-1 expressing yeast cells treated with ketoconazole and fluconazole antifungals[J].*Talanta*, 2024, 276.DOI:10.1016/j.talanta.2024.126248.
2. Oi-Jurjevi B , Borkovi-Miti S , Pavlovi S ,et al.Lemon Flavonoid Extract Eriomin Improves Pro/Antioxidant Status and Interferes with Cholesterol Metabolism without Affecting Serum Cholesterol Levels in Aged Rats[J].*International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(10).DOI:10.3390/ijms25105221.
3. Prvulovic M , Pavlovic S , Mitic S B ,et al.Mitigating the effects of time in the heart and liver: The variable effects of short- and long-term caloric restriction[J].*Mechanisms of Ageing and Development*, 2024, 222.DOI:10.1016/j.mad.2024.111992.
4. Bozkurt A S , Tilmaz S G .Ferroptotic Potency of ISM1 Expression in the Drug-Induced Alzheimer's Disease-Like Phenotype Under the Influence of Betulin[J].*Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 2023, 96(4):1565-1578.DOI:10.3233/JAD-230940.
5. Ayenur Güler, Yardmc B K , Zek N I .Human anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins protect yeast cells from aging induced oxidative stress [J].*Biochimie* [2025-02-10]. DOI: 10.1016/j.biochi.2024.10.009.

