

(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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://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 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化为 $\text{Fe}^{3+}$ ，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 $\mu\text{mol/L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ 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( $\mu\text{L}$ )	0	10	20	40	50	60	80	100
双蒸水( $\mu\text{L}$ )	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
$0.612 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$  的待测样本。  
标准孔：向酶标板对应的标准孔中加入 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品。
- ② 向步骤①各孔中加入 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  的试剂二。
- ⑤ 酶标仪上振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$  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( $\mu\text{L}$ )	20	--
不同浓度标准品( $\mu\text{L}$ )	--	20
试剂一( $\mu\text{L}$ )	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( $\mu\text{L}$ )	50	50
酶标仪上振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\Delta A$ 值-空白孔 $\Delta A$ 值(标准品浓度为0的 $\Delta A$ 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta A_{590}$ : 样本的绝对 $\Delta A$ 值(样本的 $\Delta A$ 值-标准品浓度为0时的 $\Delta A$ 值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{\text{pr}}$ : 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

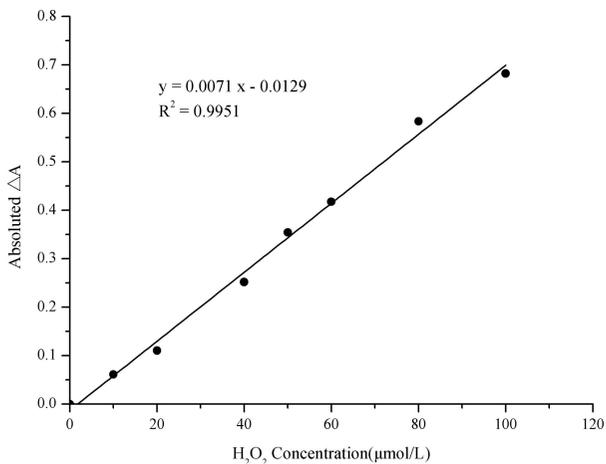
检测范围	2.5-100 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	平均批间差	3.5 %
灵敏度	2.5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	平均批内差	2.3 %

## 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  $\mu\text{L}$ ，按照操作步骤进行实验，读取各点OD并计算平均 $\Delta A$ 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
$\Delta A$	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 $\Delta A$ 值	0.085	0.146	0.195	0.337	0.439	0.502	0.668	0.767
绝对 $\Delta A$ 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)：



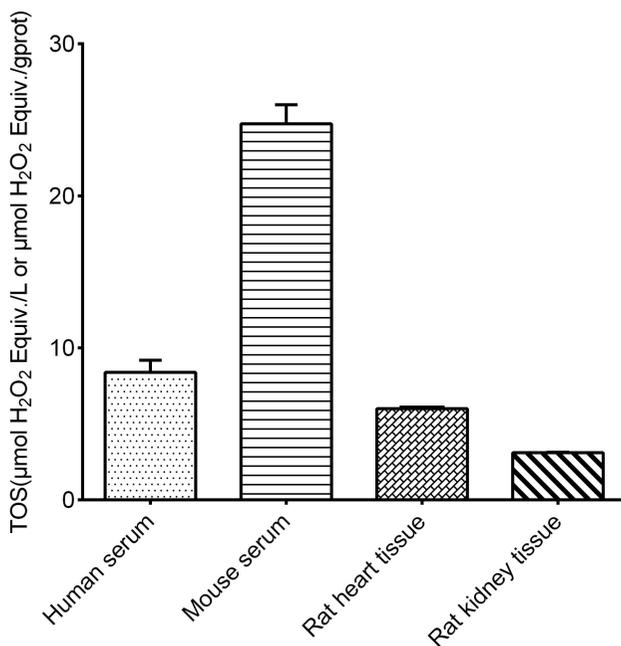
## 附录2 实例分析

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  $\mu\text{L}$ 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 $\Delta A$ 值为0.142,空白孔 $\Delta A$ 值为0.098,则样本的绝对 $\Delta A$ 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  $\mu\text{L}$ )、小鼠血清(加样量20  $\mu\text{L}$ )、大鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度为8.42  $\text{gprot/L}$ ,加样量20  $\mu\text{L}$ )和大鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为11.71  $\text{gprot/L}$ ,加样量20  $\mu\text{L}$ )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.



