

(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-K042-M

产品规格：48T(44 samples)/96T(92 samples)

检测仪器：酶标仪(540-560nm)

Elabscience®羟自由基清除能力比色法 测试盒（Fenton 法）

Hydroxyl Free Radical Scavenging Capacity Colorimetric Assay Kit (Fenton 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组织样本、血清(浆)等液体样本清除羟自由基的能力。

检测原理

芬顿 (Fenton) 反应是最常见的产生羟自由基 ($\text{OH}\cdot$) 的化学反应, 过氧化氢的量和 Fenton 反应产生的 $\text{OH}\cdot$ 量成正比, 当给予电子受体后, 用 griess 试剂显色, 形成红色物质, 其呈色与 $\text{OH}\cdot$ 的多少成正比关系。样本中含有的清除羟自由基的物质, 能消耗 $\text{OH}\cdot$, 检测剩余的 $\text{OH}\cdot$, 来反映出清除羟自由基的能力。

本试剂盒检测动植物组织样本时, 需要测定蛋白浓度。动物组织样本推荐使用 BCA 法(货号: E-BC-K318-M); 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size)(48 T)	规格 2 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	标准品贮备液 (Standard Stock Solution)	0.5 mL×1 支	0.5 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物贮备液 (Substrate Stock Solution)	0.5 mL×1 支	0.5 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	A 溶液 (A Solution)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	B 溶液 (B Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	终止液 (Stop Solution)	1.6 mL×1 支	3.2 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	16 mL×1 瓶	32 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	16 mL×1 瓶	32 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
	酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	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(540-560 nm，最适检测波长 550 nm)、恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl) (2-8℃)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25℃)

② 9.79 mmol/L标准品的配制：

按试剂一：双蒸水=1：99的体积比稀释，按需配制，8 h内使用有效。

③ 试剂二工作液的配制：

按试剂二：双蒸水=1：99的体积比稀释，按需配制，8 h内使用有效。

④ 试剂三工作液的配制：

按试剂三：双蒸水=1：9的体积比稀释，按需配制，8 h内使用有效。

⑤ 反应工作液的配制：

按试剂三工作液：试剂四=1：1的体积比，充分混匀，按需配制，8 h内使用有效。

⑥ 试剂五工作液的配制：

按试剂五：双蒸水=1：9的体积比稀释，按需配制，未用完部分2-8℃保存3天。

⑦ 显色工作液的配制：

按试剂五工作液：试剂六：试剂七=8：4：4的体积比，充分混匀，按需配制，8 h内使用有效。

⑧ 检测前，试剂二工作液、反应工作液需37℃孵育3min。

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：可直接测定。

组织样本：取0.020-1.0 g新鲜组织块，按照样本重量(g)：生理盐水体积(mL)=1：9的比例加入生理盐水(0.9% NaCl) (2-8℃)，进行机械匀浆，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清检测蛋白浓度。

② 样本抑制率的计算

本试剂盒可检测抑制率范围在20%-50%之间，最佳抑制率范围40%-50%，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）。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

③ 样本的稀释

不同样本的稀释如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	8-32	人血浆	32-64
10%大鼠肺组织	32-64	小鼠血清	16-32

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl) (2-8℃)。

实验关键点

- ① 反应时间应准确以秒表计时。
- ② 加完反应工作液后应迅速混匀。
- ③ 为保证反应时间准确，一次测定样本个数控制在 3 个以下。

操作步骤

- ① 空白管：取 200 μL 双蒸水，加入到 2 mL EP 管中；
标准管：取 100 μL 双蒸水，加入到 2 mL EP 管中；
对照管：取 100 μL 双蒸水，加入到 2 mL EP 管中；
- ② 向步骤①中的标准管中加入 100 μL 9.79 mmol/L 标准品；
向步骤①中的对照管和测定管中加入 100 μL 试剂二工作液；
- ③ 向步骤②中的测定管中加入 100 μL 待测样本；
- ④ 向步骤③中各管加入 200 μL 反应工作液；
- ⑤ 反应工作液加完立刻开始计时，并混匀，37°C 准确反应 1 min，然后立即向步骤④中各管加入 1 mL 显色工作液终止反应；
- ⑥ 混匀，取 200 μL 于 96 孔酶标板相应孔中，室温静置 20 min 后，酶标仪于波长 550 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水(μL)	200	100	100	
9.79 mM 标准品(μL)		100		
试剂二工作液(μL)			100	100
待测样本(μL)				100
反应工作液(μL)	200	200	200	200
反应工作液加完立刻开始计时，并混匀，37°C 准确反应 1 min				
显色工作液(mL)	1	1	1	1
混匀，取 200 μL 于 96 孔酶标板中，室温静置 20 min 后，酶标仪于波长 550 nm 处测定各孔 OD 值。				

本试剂盒检测动植物组织样本时，需要测定蛋白浓度。动物组织样本推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)；植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

血清(浆)中羟自由基清除能力的计算：

定义：规定每毫升血清(浆)在 37°C 下反应 1 min，使反应体系中底物浓度降低 1 mmol/L 为一个羟自由基清除能力单位。

$$\text{羟自由基清除能力} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times 9.79^* \div V \times f$$

(U/mL)

组织中羟自由基清除能力的计算：

定义：规定每毫克组织蛋白在 37°C 下反应 1 min，使反应体系中底物浓度降低 1 mmol/L 为一个羟自由基清除能力单位。

$$\text{羟自由基清除能力} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times 9.79^* \div (C_{\text{pr}} \times V) \times f$$

(U/mgprot)

注解：

A_{对照}：对照孔 OD 值

A_{测定}：测定孔 OD 值

A_{标准}：标准孔 OD 值

A_{空白}：空白孔 OD 值

9.79*：标准品浓度，9.79 mmol/L

V：加入样本的体积，mL

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：待测样本蛋白浓度(mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

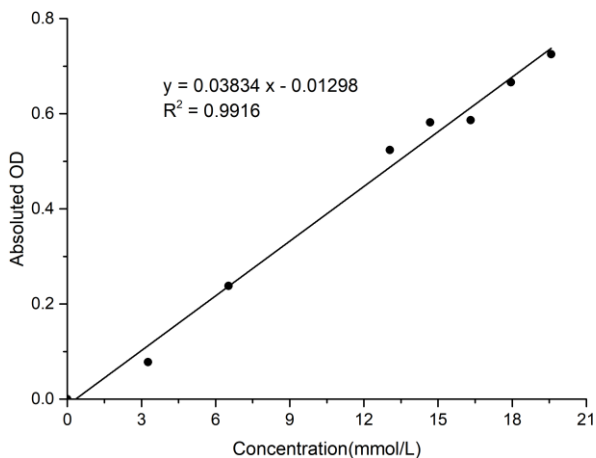
检测范围	1.46-82.89 U/mL	批间差	4.49-7.19%
灵敏度	1.46 U/mL	批内差	2.19-5.42%

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度的标准品上样量100 μ L，按照操作步骤进行实验，测得各浓度标准品OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0.00	3.26	6.53	13.05	14.69	16.32	17.95	19.58
OD 值	0.038	0.118	0.276	0.560	0.613	0.623	0.705	0.763
	0.039	0.115	0.277	0.564	0.628	0.627	0.704	0.764
平均 OD 值	0.039	0.117	0.277	0.562	0.621	0.625	0.705	0.764
绝对 OD 值	0.000	0.078	0.238	0.524	0.582	0.587	0.666	0.725

② 按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



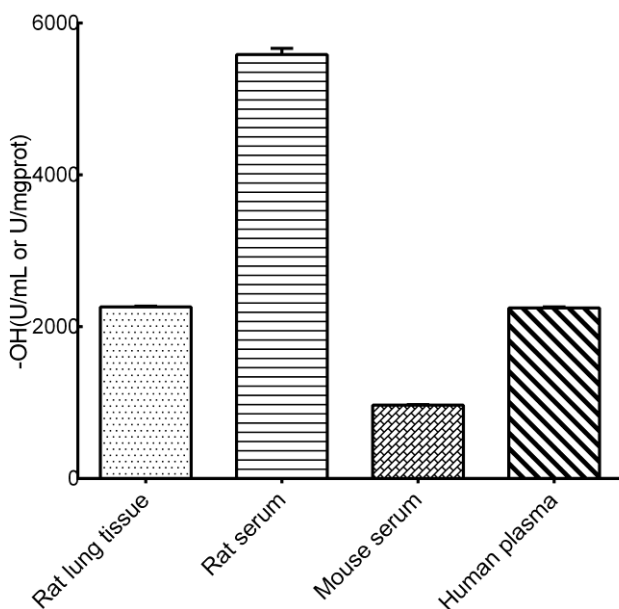
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取100 μL 稀释16倍后人血清样本, 按操作表操作, 结果如下: 标准孔OD值为0.375, 对照孔OD值为0.569, 测定孔OD值为0.382, 空白孔OD值为0.039, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{羟自由基清除能力} &= \frac{0.569 - 0.382}{0.375 - 0.039} \times 9.79 \div 0.1 \times 16 = 871.78 \text{ U/mL} \\ (\text{U/mL}) \end{aligned}$$

按照说明书操作, 测定大鼠肺组织(10%组织匀浆, 稀释32倍, 加样量100 μL)、大鼠血清(稀释150倍, 加样量100 μL)、小鼠血清(稀释32倍, 加样量100 μL)、人血浆(稀释64倍, 加样量100 μL)羟自由基清除能力(如下图):



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。

