

(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-K527-M

产品规格: 48T(44 samples)/96T(92 samples)

检测仪器: 酶标仪(500-530 nm)

Elabscience®羟自由基清除能力比色法测试盒

Hydroxyl Free Radical Scavenging Capacity 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组织样本及血清(浆)等液体样本清除羟自由基的能力。

检测原理

H_2O_2/Fe^{2+} 通过 Fenton 反应产生羟自由基，水杨酸能有效捕捉产生的羟自由基并与其反应生成有色物质 2, 3-二羟基苯甲酸，在 510 nm 处有特征吸收峰，加入具有清除能力的物质后，有色物质减少，从而根据吸光值的数值判断样品清除羟自由基的能力。

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)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8°C 避光 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8°C 避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 C (Substrate C)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 12 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(500-530 nm，最佳检测波长 510 nm)

试剂：无水乙醇

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

每瓶试剂一粉剂用10 mL无水乙醇溶解，混匀，2-8°C避光可保存一个月。

③ 试剂二工作液配制：

每瓶试剂二粉剂用8 mL双蒸水溶解，混匀，2-8°C避光可保存一个月。

样本准备

① 样本处理

血清样本：可直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为双蒸水。

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，结合本试剂盒的清除能力范围(10-50%)，可参考下表稀释(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
狗血清	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
大鼠血清	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

注：稀释液为双蒸水。

实验关键点

- ① 试剂一取用后应及时密封，不可长时间暴露于空气中。
- ② 反应液加入到酶标板孔中时应触底加入。

操作步骤

- ① 对照管：取 100 μL 的试剂一工作液于 1.5 mL 的 EP 管中；
测定管：取 100 μL 的试剂一工作液于 1.5 mL 的 EP 管中；
空白管：取 100 μL 的试剂一工作液于 1.5 mL 的 EP 管中；
- ② 向步骤①的对照管中加入 100 μL 的试剂二工作液；
向步骤①的测定管中加入 100 μL 的试剂二工作液；
- ③ 向步骤②的对照管中加入 500 μL 的双蒸水；
向步骤②的测定管中加入 480 μL 的双蒸水；
向步骤①的空白管中加入 600 μL 的双蒸水；
- ④ 向步骤③各管中加入 200 μL 的试剂三；
- ⑤ 向步骤④测定管中加入 20 μL 待测样本；
- ⑥ 涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱准确孵育 20 min，取 200 μL 于 96 孔酶标板相应孔中，波长 510 nm 处测定各孔 OD 值。(注：当测定管中有浑浊时，会影响测定结果，可 10000 \times g 常温离心 5 min 后，再取上清液测定)。

操作表

	对照管	空白管	测定管
试剂一工作液(μL)	100	100	100
试剂二工作液(μL)	100	--	100
双蒸水(μL)	500	600	480
试剂三(μL)	200	200	200
待测样本(μL)	--	--	20
涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱准确孵育 20 min，取 200 μL 于 96 孔酶标板相应孔中，波长 510 nm 处测定各孔 OD 值。			

注：当测定管中有浑浊时，会影响测定结果，可 10000 \times g 常温离心 5 min 后，再取上清液测定

结果计算

$$\text{羟自由基清除能力}(\%) = \frac{A_1 - A_3}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

注解:

A₁: 对照孔 OD 值

A₂: 空白孔 OD 值

A₃: 测定孔 OD 值

注: 当样本的羟自由基清除能力在10%以下或50%以上时, 可适当增加样本上样量或将样本稀释, 保证清除能力在10-50%之间; 为了比较不同样本羟自由基清除能力, 在增加上样量的同时, 可减少反应体系中双蒸水的加入量, 保证测定管的最终反应体积不变。

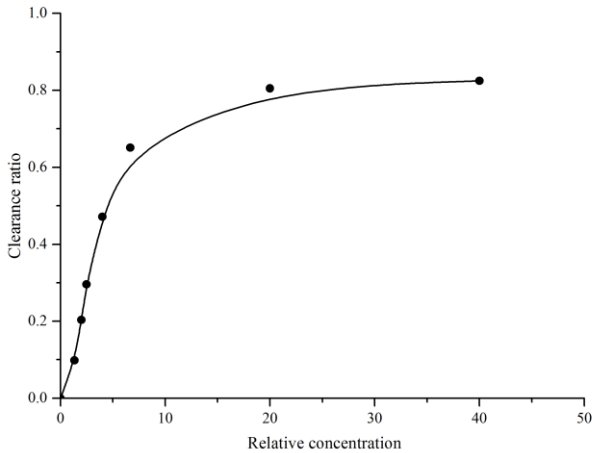
附录1 关键数据

1. 技术参数

平均批内差	4.1 %	平均批间差	4.6 %
-------	-------	-------	-------

2. 清除能力曲线

将人血清用双蒸水稀释不同倍数，然后测定其羟自由基清除能力，绘制曲线如下图，得出线性比较区间：10%-50% (数据仅供参考)：



附录2 实例分析

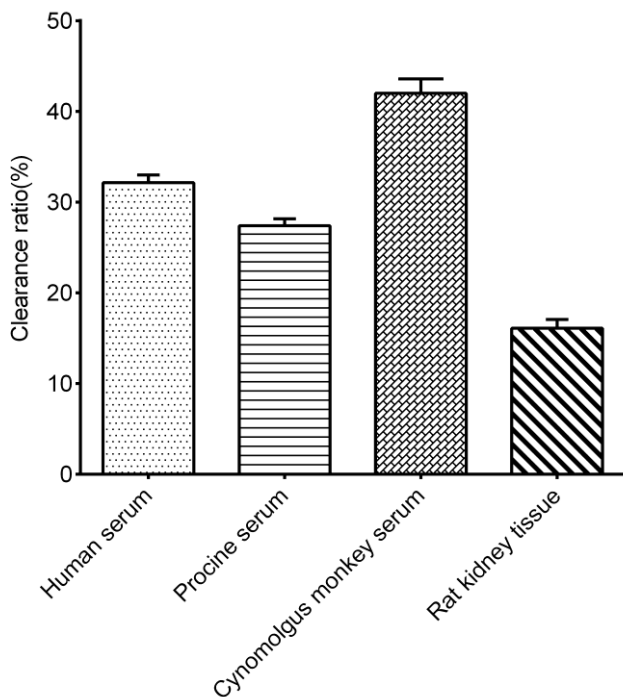
例如检测人血清(数据仅供参考):

取20 μL 人血清加入到相应测定管中,按操作表检测,结果如下:

对照孔平均OD值为0.803,空白孔平均OD值为0.038,测定孔平均OD值为0.557,计算结果为:

$$\text{羟自由基清除能力}(\%) = \frac{0.803 - 0.557}{0.803 - 0.038} \times 100\% = 32.2\%$$

按照说明书,测定人血清(加样量20 μL)、猪血清(加样量20 μL)、食蟹猴血清(加样量20 μL)和10%大鼠肾组织匀浆(加样量20 μL)中的羟自由基清除能力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
计算结果超出10-50%的范围	样本清除能力过高或过低	适当增加上样体积或稀释样本
测值不稳定，复孔差异大	测定管中存在悬浮物质	可常温离心后再次测定
	酶标板孔中存在气泡	按要求使用微量移液器，移取液体时不要产生气泡

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同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. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675
11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on

- monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
 13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
 14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
 15. Chagas TQ, Freitas N, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
 16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
 17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
 18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
 19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
 20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
 21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell

Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113

22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508