

羟自由基 (OH⁻) 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY013 微板法 96 样)

一、产品简介:

羟自由基 (OH⁻) 是活性氧的一种。2-脱氧核糖在羟自由基 (OH⁻) 存在下被氧化成丙二醛类似物, 接着与硫代巴比妥酸(TBA)缩合生成有色产物, 通过测定该有色产物在 532nm 的最大吸收峰, 进而计算出羟自由基 (OH⁻) 含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 2 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、羟自由基 (OH⁻) 含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃ ×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清液测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接测定, 若浑浊则离心后取上清液测定。

2、上机检测:

① 打开酶标仪预热 30min, 同时水浴锅或者金属浴加热到 95℃。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	60	60
试剂一	60	180
试剂二	120	
35℃避光孵育 1 小时		
试剂三	240	240
混匀, 在 95℃水浴中保温 10min, 取出放冰上冷却, 25℃, 观察是否浑浊, 若浑浊则 12000rpm 离心 3min, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 于 532nm 处读取吸光度 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】: 若 ΔA 值低于 0.005, 可增加上清液体积 V1 (如增至 120μL, 则试剂一为 0μL) 或增加取样质量 W (如增至 0.3g), 则改变后的 W 和 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量(A*1000/g 鲜重)}=\Delta A\div(W\times V1\div V)\times 10^3=16.7\times\Delta A\div W\times 10^3$$

2、按细菌/细胞计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量(A*1000/10}^4\text{ cell)}=\Delta A\div(500\times V1\div V)\times 10^3=16.7\times\Delta A\div 500\times 10^3$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量(A*1000/mL)}=\Delta A\div V1\times 10^3=16.7\times\Delta A\times 10^3$$

V---样本提取液的总体积， 1 mL；

500---细胞数量， 万；

A---absorbance units。

V1---加入反应体系样本体积， 0.06mL；

W---样本质量， g；