

羟自由基 (OH[·]) 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY013 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 2 瓶	4℃ 避光保存	每瓶: 1. 若有沉淀析出, 50℃水浴至溶解; 2. 溶解后一个月内使用完毕, 可室温避光保存, 长期保存则需 4 度避光保存 (保存期间若有沉淀析出可再次 50℃水浴至溶解待用)。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

① 打开酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 同时水浴锅或者金属浴加热到 95℃。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (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 V_1 （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 V_1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 含量 ($A \times 1000/\text{g}$ 鲜重) = $\Delta A \div (W \times V_1 \div V) \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \div W \times 10^3$

2、按蛋白浓度计算：

羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 含量 ($A \times 1000/\text{mg prot}$) = $\Delta A \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times 10^3$

3、按照液体体积计算：

羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 含量 ($A \times 1000/\text{mL}$) = $\Delta A \div V_1 \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \times 10^3$

4、按细菌/细胞计算：

羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 含量 ($A \times 1000/10^4 \text{ cell}$) = $\Delta A \div (500 \times V_1 \div V) \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \div 500 \times 10^3$

V ---样本提取液的总体积，1 mL；

V_1 ---加入反应体系样本体积，0.06mL；

500---细胞数量，万；

W ---样本质量，g；

A ---absorbance units。

C_{pr} ---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。