

羟自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY006-196 微板法 196 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

Fenton 反应是最常见的产生羟自由基的化学反应, H_2O_2 的量和 Fenton 反应产生的 $\text{OH}\cdot$ 量成正比, Fenton 反应生成的羟自由基与水杨酸反应, 生成物在 510nm 处有特殊吸收。采用固定反应时间法, 根据测试物在 510nm 处吸光度值的大小来判断测试物清除羟自由基的能力。

二、试剂盒的组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉体 6 瓶	4℃ 保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 6 瓶	4℃ 避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4mL 无水乙醇, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 0.15mL×2 支	KY0064℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 取 60 μL 至新的容器中, 再加 6mL 蒸馏水溶解备用, 一周内用完。

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 0.1g 样本 (若是干样可取 0.02-0.05g), 加入 1mL 的 80%乙醇 (自备) 进行匀浆, 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 50℃, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次)。若有损耗需用 80%乙醇定容至 1mL, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清待测。
- 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 的 80%乙醇 (自备), 于 50℃, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次)。若有损耗需用 80%乙醇定容至 1mL, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清待测。
- ③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 510nm。

- ② 不同样本清除能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 测定-A 对照接近零，需对样本进行稀释（用提取液稀释即可）后再检测，或降低样本加样量（如减至 20μL，蒸馏水相应增加）。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白 (仅做一次)
试剂一	50	50	50
试剂二	50	50	50
样本	50	50	
蒸馏水	200	250	250
试剂三	50		50

混匀，37℃反应 20min（准确时间），若测定管和对照管有浑浊现象，可于 8000rpm 室温下离心 5min，取 200μL 澄清液体转移至 96 孔板内，立即于 510nm 处读取各管吸光值 A。

【注】1. 加完试剂三后反应开始启动。

2. 若 A 测定-A 对照的差值与空白管接近，可增加样本加样量（如由 50μL 增至 100μL，蒸馏水相应减少）。

五、结果计算：

羟自由基清除率(%)=[A 空白-(A 测定-A 对照)]÷A 空白×100%