

羟自由基清除能力试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

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 $OH\cdot$ 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:

试剂名称	规格	保存要求	
试剂一	粉体 mg×4 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体×4 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4mL 无水乙醇, 充分溶解备用。
试剂三	液体 0.15mL×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部, 取 80 μ L 至新的容器中, 再加 8mL 蒸馏水溶解备用, 一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、天平、水浴锅、离心机、研钵、可调式移液器、冰、蒸馏水。

四、羟自由基清除能力测定:

建议选取 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 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), 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, 置冰上待测。
- ③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 分光光度计预热 30min, 调节波长至 510nm, 蒸馏水调零。
- 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) 后再检测, 或降低样本加样量 (如减至 60 μ L, 蒸馏水相应增加)。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
试剂一	125	125	125
试剂二	125	125	125
样本	125	125	
蒸馏水	500	625	625
试剂三	125		125

混匀，37°C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，取全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，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 125 μ L 增至 250 μ L，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%