

## 羟自由基清除能力试剂盒说明书

(微板法 96 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×3 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×3 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 60μL 至新的容器中，再加 6mL 蒸馏水溶解备用，一周内用完。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min，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：

试剂名称 (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°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 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%