

羟自由基清除能力测定试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

羟自由基作用于体内蛋白质、核酸、脂类等生物分子，造成细胞结构和功能受损，进而导致体内代谢紊乱引起疾病。羟自由基清除能力是样品抗氧化能力的重要指标之一，在抗氧化类保健品和药品研究中得到广泛应用。

测定原理：

H₂O₂/ Fe²⁺ 通过Fenton反应产生羟自由基，将邻二氮菲- Fe²⁺水溶液中Fe²⁺氧化为Fe³⁺，导致536nm吸光度下降，样品对536nm吸光度下降速率的抑制程度，反映了样品清除羟自由基的能力。

自备实验用品：

恒温水浴锅、酶标仪、96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100 mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体12mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体6mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体12 mL×1瓶，4℃保存。

试剂四：液体6mL×1瓶，4℃保存。

样品的制备：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，然后10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 血清、果汁等液体样品可直接测定。
3. 提取物（或者药物）可配制成一定浓度，如5 mg/mL。

操作步骤：

1. 酶标仪预热30min，调节波长至536nm。
2. 工作液配制：使用之前按照每管试剂一：试剂二：试剂三=100:50:100（ μ L）的比例配制，用多少配多少，混匀。
3. 在EP管中加入如下试剂

	空白管	对照管	测定管
工作液（ μ L）	250	250	250
混匀，防止局部颜色过浓			
样品（ μ L）			50
试剂四（ μ L）		50	50

H ₂ O (μL)	100	50	
混匀, 37°C保温60min, 8000g 25°C离心5min, 吸取200μL于96孔板中测定536nm处吸光值, 空白管、对照管和测定管的吸光值分别记为A空、A对和A测。			

注意: 空白管和对照管只需测定一次。

计算公式:

$$\text{羟自由基清除率 } D\% = (A_{\text{测}} - A_{\text{对}}) \div (A_{\text{空}} - A_{\text{对}}) \times 100\%$$

A空、A对、A测: 空白管、对照管和测定管的吸光值。

注意事项:

为了比较不同样品羟自由基清除能力, 对于同一批样品必须加入等量的样品, 血清、组织匀浆、果汁等液体样品加入同样体积, 提取物(或者药物)配制成同样浓度。