羟自由基（OH^-）含量试剂盒说明书

（货号：ADS-F-KY013　分光法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 10mL×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； 3. 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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（10^4）：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 打开可见分光光度计预热 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	100	100

试剂一	100	300
试剂二	200	
35℃避光孵育 1 小时		
试剂三	400	400
混匀后，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 12000rmp 离心 3min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 532nm 处读取吸光度 A。ΔA = A 测定-A 对照。		

【注】：若ΔA 值低于 0.005，可增加上清液体积 V1（如增至 200μL，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 V1 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（OH^-）含量(A*1000/g 鲜重)=ΔA÷(W×V1÷V)×10^3=10×ΔA÷W×10^3

2、按蛋白浓度计算：

羟自由基（OH^-）含量(A*1000/mg Prot)=ΔA÷(Cpr×V1÷V)×10^3=10×ΔA÷Cpr×10^3

3、按照液体体积计算：

羟自由基（OH^-）含量(A*1000/mL)=ΔA÷V1×10^3=10×ΔA×10^3

4、按细菌/细胞计算：

羟自由基（OH^-）含量(A*1000/10^4 cell)=ΔA÷(500×V1÷V)×10^3=10×ΔA÷500×10^3

V---样本提取液的总体积，1 mL；　　V1---加入反应体系样本体积，0.1mL；

500---细胞数量，万；　　W---样本质量，g；

A---absorbance units。

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL ； 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。