

羟自由基清除能力试剂盒说明书

(货号：ADS-W-KY006-48 微板法 48 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 $OH\cdot$ 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 2 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 3mL 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 2 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 50μL×1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 取 30 μL 至新的容器中，再加 3mL 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%