

羟自由基(OH[·])测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A018-1-1 比色法 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

本试剂盒是用于测定抑制或产生羟自由基能力的,并非用于测定样本羟自由基含量,望用户多注意。

一、测定原理:

Fenton 反应是最常见的产生羟自由基的化学反应, H₂O₂ 的量和 Fenton 反应产生的 OH 量成正比,当给予电子受体后,用 griess 试剂显色,形成红色物质,其呈色与 OH 的多少成正比关系。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

- 试剂一:** 3%H₂O₂ 标准品贮备液 0.5mL×1 支, 4℃ 保存。
0.03% 标准品应用液的配制: 3%H₂O₂ 标准贮备液: 双蒸水=1:99 稀释, 现用现配。
- 试剂二:** 底物贮备液 1mL×1 支, 4℃ 保存。
底物应用液的配制:
①、若您的样本为抑制羟自由基型,即测定管吸光度比对照管吸光度低,则底物应用液的配制: 底物贮备液: 双蒸水=1:99 稀释, 现用现配。
②、若您的样本为产生羟自由基型,即测定管吸光度比对照管吸光度高,则底物应用液的配制: 底物贮备液: 双蒸水=1:299 稀释, 现用现配。
- 试剂三:** 甲液贮备液 2mL×1 支, 4℃ 保存, 用时加双蒸水 1:9 稀释成应用液。乙液 7mL×2 支, 4℃ 保存。
试剂三应用液的配制: 甲液应用液与乙液等比例混合, 用多少配多少, 余下 4℃ 保存。
- 试剂四:** 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。用时加双蒸水稀释至 100mL, 制备成应用液, 4℃ 保存。若有结晶, 则放置 37℃ 水浴至全部溶解后再稀释。
- 试剂五:** 液体 30mL×1 瓶, 避光 4℃ 保存。
试剂六: 液体 30mL×1 瓶, 避光 4℃ 保存。
试剂七: 分析纯的冰乙酸(冰醋酸)自备。
显色剂的配制: 试剂四应用液: 试剂五: 试剂六: 冰乙酸=8:3:3:2, 现用现配。

[注]: 抑制羟自由基型的物质如: 血清(浆)、各种组织匀浆液、口服液等; 产生羟自由基型的物质如: 中性白细胞、某些药物、部分植物等。

三、测试所需仪器和试剂:

含 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅、各种规格移液器、烧杯或试剂瓶(用于配制显色剂, 空试剂瓶本公司有售)、一次性塑料试管或离心管(5ml 或以上规格)、计时器、双蒸水、生理盐水(0.9%)、冰乙酸(分析纯, 浓度 99.5% 以上)、涡旋混匀器、台式低速离心机、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)、血红蛋白测定试剂(全血或红细胞用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

以上配制好的应用液, 先在 37℃ 水浴中预温 3 分钟, 以下操作在 37℃ 水浴锅中进行。

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.4	0.2	0.2	
0.03% H ₂ O ₂ 标准应用液 (mL)		0.2		
底物应用液 (mL)			0.2	0.2
样本* (mL)				0.2
试剂三应用液 (mL)	0.4	0.4	0.4	0.4
在加完试剂三的同时开始计时, 迅速涡旋混匀, 37℃ 反应 1 分钟(准确以秒表计时), 然后立即加入显色剂终止反应。				
显色剂 (mL)	2	2	2	2

混匀, 室温放置 20 分钟后, 1cm 光径, 550nm, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。

***参考取样:** 血清(浆)样本用生理盐水 20 倍稀释后取 0.2mL 作检测; 若您有精确微量移液器, 可直接取 0.010mL 血清(浆), 再加 0.190mL 生理盐水。10%组织匀浆上清, 取 0.2mL 检测。具体取样浓度需根据预试结果确定, 详细预试方法见附录。

五、计算及举例:

(一)、血清(浆)中抑制羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫升血清(浆)在 37℃ 下反应 1 分钟, 使反应体系中 H₂O₂ 浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times N$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;
V_样: 取样量, 0.2mL;
N: 样本测试前稀释倍数。

(二)、组织中抑制羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫克组织蛋白在 37℃ 下反应 1 分钟, 使反应体系中 H₂O₂ 的浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}})$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;
V_样: 取样量, 0.2mL;
N: 样本测试前稀释倍数;
C_{pr}: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

(三)、溶血液中抑制羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫克血红蛋白在 37℃ 下反应 1 分钟, 使反应体系中 H₂O₂ 的浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/ngHb)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times N \div CHb$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;
V_样: 取样量, 0.2mL;
N: 样本测试前稀释倍数;

CHb: 溶血液血红蛋白浓度, mgHb/mL (Hb 指血红蛋白)。

(四)、产生羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫升或每毫克物质或每立方厘米内 10⁶ 个细胞在本反应体系中使反应液中 H₂O₂ 的浓度增加 1mmol/L 为一个产生羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{产生羟自由基能力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times N$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;
V_样: 取样量, 0.2mL;
N: 样本测试前稀释倍数。

五、注意点:

- 1、每一只管子反应时间一分钟(从加入试剂三到加入显色剂的时间)一定要准确。
- 2、必须严格按照操作表顺序加试剂, 不可配制混合试剂。

- 3、检测样本溶剂或介质可为生理盐水、双蒸水，但不能为磷酸缓冲液、无水乙醇或其它有机溶剂。
- 4、此法检测灵敏度较高，检测血清（浆）和组织以外样本时，最好先取原液及不同浓度稀释后的样本,例如 5 倍稀释液或 10 倍稀释液做预试。如测定管颜色太浅可将样本用其溶剂继续稀释至颜色较深为止。我所曾检测花粉的水提液的羟自由基，将其原液稀释 150 倍后，显色较好。
- 5、本法适用于分光光度计或酶标仪（酶标仪读数时各管取 200μL 反应液加到 96 孔板中 550±10nm 处读数）测定。

附录：样本最佳取样浓度摸索

一、样本前处理：

- 1、血清（浆）：用生理盐水将血清（浆）按 1：1、1：4、1：9、1：19 等稀释成一系列不同浓度的血清（浆），分别取不同浓度的血清（浆）0.2mL 按血清（浆）的测定操作表进行检测。
- 2、组织匀浆、细胞、线粒体或细胞膜等组织：分别用生理盐水将组织匀浆液稀释成 10%、5%、2%、1%、0.5%、0.1%等一系列不同浓度的组织匀浆，分别取不同浓度的组织匀浆 0.2mL 按组织的测定操作表进行检测。

二、操作步骤（以血浆样本为例作最佳取样浓度摸索）：

- 1、样本来源：正常组大鼠眼眶取全血，肝素抗凝取血浆进行测定。
- 2、样本稀释：用生理盐水将血浆按 1：1、1：4、1：9、1：19、1：49、1：99 稀释成一系列不同浓度的血浆，分别取不同浓度的血浆 0.2mL 按血清（浆）的测定操作表进行检测。

3、操作表：

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水（mL）	0.4	0.2	0.2	
0.03%H ₂ O ₂ 标准应用液（mL）		0.2		
试剂二(底物应用液)（mL）			0.2	0.2
样本*（mL）				0.2
试剂三（mL）	0.4	0.4	0.4	0.4
在加完试剂三的同时开始计时，迅速混匀，37℃反应 1 分钟（准确以秒表计时），然后立即加入显色剂终止反应。				
显色剂（mL）	2	2	2	2
混匀，室温放置 20 分钟后，1cm 光径，550nm，双蒸水调零，测各管吸光度值。				

4、预试结果：

对照	0.785		空白	0.003	标准	0.443
稀释比例	1:1	1:4	1:9	1:19	1:49	1:99
吸光度值	0.105	0.132	0.188	0.408	0.677	0.741
抑制率	86.59%	83.16%	76.01%	47.99%	13.71%	5.66%

5、结论：

从上面的数据统计可以看出，抑制率 $(\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%)$ 在 45%~55%之间的最佳取样浓度为 1:19，即取 1:19 稀释后正常大鼠血浆取 0.2mL 测定。

三、讨论：

在您进行正式检测之前，需要从每组中取 2-3 个样本进行上面的预实验，以确定最佳样本浓度或最佳取样量；在保证抑制率 $(\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%)$ 在 20%-55%之间的同时，每组之间应该有所差异，如有疑问，则需重新摸索最佳样本浓度或最佳取样量。