



羟自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: PB1016W96 微量法 96样)

有效期: 3个月

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:

试剂一: 液体 5 mL×1 瓶, 4℃避光保存。

试剂二: 液体 15 mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂三: 液体 3 mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂四: 液体 3 mL×1 瓶, 4℃保存。

样品的制备:

1. 组织: 按照组织质量(g): 蒸馏水体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 蒸馏水)进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 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。
4. 细菌、细胞样品: 按照细菌、细胞数量(10⁴ 个): PBS体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细菌、细胞加入 1mL PBS), 冰浴超声波破碎(功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

操作步骤:

- 1、酶标仪预热30min, 调节波长至536nm。
- 2、在EP 管中加入如下试剂

	空白管	对照管	测定管
试剂一 (μL)	45	45	45
试剂二 (μL)	120	120	120
试剂三 (μL)	30	30	30
立即混匀, 防止局部颜色过浓			



样品 (μL)			75
试剂四 (μL)		30	30
H ₂ O (μL)	105	75	
混匀、37℃，60min，取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中测定 OD ₅₃₆ 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：

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。