羟自由基清除能力检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10287

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.16 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1、 试剂四：试剂放于试剂瓶内 EP 管中。临用前加入 9.84 mL 蒸馏水混匀，也可按比例现用现配，配好的试剂 2-8℃保存 4 周。

产品说明：

羟自由基是人体在新陈代谢过程中产生的对生物体毒性强、危害大的一种自由基。它可以使组织中的糖类、氨基酸、蛋白质、核酸等物质发生氧化，遭受氧化性损伤和破坏，导致细胞坏死或突变。羟自由基清除能力是样本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。

H_2O_2/Fe^{2+}通过Fenton反应产生羟自由基，将邻二氮菲-Fe^{2+}水溶液中Fe^{2+}氧化为Fe^{3+}，导致536nm的吸光度下降，样本536nm吸光度下降速率的抑制程度，反映了样本清除羟自由基的能力。

$$H_2O_2 + [Fe(phen)_3]^{2+}(536nm) \longrightarrow OH + [Fe(phen)_3]^{3+}$$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织样本的制备：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清、果汁等液体样本可直接测定。若溶液有浑浊则离心后去上清进行测定。

3、提取物（或者药物）可配制成一定浓度，如 5mg/mL。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至536nm，蒸馏水调零。
2. 操作表：在1.5mLEP管中分别加入下列试剂

试剂名称	空白管	对照管	测定管
试剂一（mL）	0.15	0.15	0.15
试剂二（mL）	0.3	0.3	0.3
试剂三（mL）	0.3	0.3	0.3
充分混匀，防止颜色不均一			
样本（mL）	-	-	0.15
试剂四（mL）	-	0.15	0.15
H_2O（mL）	0.75	0.60	0.45
涡旋混匀，置于 37℃水浴锅/恒温培养箱准确反应 60min。10000rpm，常温离心 10min，取各上清分别测定 536nm 处的吸光度，分别记为 A 空、A 对和 A 测。空白管和对照管只需测定 1-2 次。			

三、计算公式

羟自由基清除率 D%=（A测-A对）÷（A空-A对）×100%

注意事项：

1. 为了比较不同样本羟自由基清除能力，对于同一批样本必须加入等量的样本，血清、组织匀浆、果汁等液体样本加入同样体积，提取物（或者药物）配制成同样浓度。
2. 样本过多时，可以按体积比试剂一：试剂二：试剂三=0.15:0.3:0.3的比例配制工作液，现用现配。

实验实例：

1、取 0.1g 肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算：羟自由基清除率 D%=（A 测-A 对）÷（A 空-A 对）×100%=(0.889-0.209)÷(0.959-0.209)×100%=90.67%。

2、取 0.1g 稗草叶加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算：羟自由基清除率 D%=（A 测-A 对）÷（A 空-A 对）×100%=(0.796-0.209)÷(0.959-0.209)×100%=78.27%。

3、取兔血清后按照测定步骤操作，测得计算：羟自由基清除率 D%=（A 测-A 对）÷（A 空-A 对）×100%=(0.629-0.209)÷(0.959-0.209)×100%=56%。

相关发表文献：

[1] Hu J, Wang Q, Wang Y, et al. Polydopamine-Based Surface Modification of Hemoglobin Particles for Stability Enhancement of Oxygen Carriers[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2020.

[2] Liang R, Zhao J, Li B, et al. Implantable and degradable antioxidant poly (ε-caprolactone)-lignin nanofiber membrane for effective osteoarthritis treatment[J]. Biomaterials, 2020, 230: 119601.

[3] Yang Y, Liu M, Wang K, et al. Chemical and cytological evaluation of honeybee pollen antioxidant ability[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(3): 824-833.

相关系列产品：

AC10283/AC10284 铜蓝蛋白（Cp）活性检测试剂盒

AC10285/AC10286 总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒

AC10297/AC10298 总巯基含量检测试剂盒