

羟自由基清除能力测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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：

H_2O_2/Fe^{2+} 通过 Fenton 反应产生羟自由基，水杨酸能有效捕捉产生的羟自由基并与其反应生成有色物质 2,3-二羟基苯甲酸，在 510nm 处有最大吸收峰，加入具有清除能力的物质后，有色物质便会减少，从而可以根据吸光值的数值判断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 12mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 12mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 22 mL×1 瓶，4℃避光保存。

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. 血清、果汁等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。

操作步骤：

- 1、酶标仪预热 30min，调节波长至 510nm。
- 2、在 EP 管中加入如下试剂

	对照管	空白管	测定管
试剂一 (μL)	100	100	100
试剂二 (μL)	100		100
H ₂ O (μL)	500	600	300
试剂三 (μL)	200	200	200
样本 (μL)			200

混匀，37℃保温 20min，吸取 200μL 于 96 孔板中测定 510nm 处吸光值，对照管、空白管和测定管的吸光值分别记为 A 对、A 空和 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 $D\% = (A_{对} - A_{测}) \div (A_{对} - A_{空}) \times 100\%$

A 对、A 空、A 测：对照管、空白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。