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，将邻二氮菲- Fe^{2+}水溶液中 Fe^{2+}氧化为 Fe^{3+} ，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:

提取液：液体 100 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 12mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 12 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃保存。

样品的制备：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）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 536nm。

2、 工作液配制：使用之前按照每管试剂一：试剂二：试剂三=100:50:100（μL）的比例配制，用多少配多少，混匀。

3、 在 EP 管中加入如下试剂

	空白管	对照管	测定管
工作液（μL）	250	250	250
混匀，防止局部颜色过浓			
样品（μL）			50
试剂四（μL）		50	50
H_2O（μL）	100	50	
混匀，37℃保温 60min，8000g 25℃离心 5min，吸取 200μL 于 96 孔板中测定 536nm 处吸光值，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 测-A 对）÷（A 空-A 对）×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。

上海抚生实业有限公司
http://www.affandi-e.com