

羟自由基测定试剂盒

说明书修订日期: 2016.06.21

Cat number: KGT010

Store at 2-8°C for 3 months, 避光

For Research Use Only (科研专用)

一、测定原理

Fenton 反应是常用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, 通过 griess 试剂显色, 生成红色物质, 其呈色程度与 OH⁻的多少成正比。

二、试剂盒组份

试剂	KGT010 50 assays	保存条件
A 标准品储存液 (3% H ₂ O ₂)	0.5ml	2-8°C
B 底物储存液	1ml	
试剂 C-1	2ml	
试剂 C-2	7ml ×2 支	
试剂 D	10 ml	
试剂 E	30 ml	2-8°C, 避光
试剂 F	30 ml	

注意事项

- 0.03%标准品工作液的配制: 3%H₂O₂ 标准贮备液:蒸馏水=1:99 稀释, 现用现配。
- 底物工作液的配制:
 - ① 若您的样本为抑制羟自由基*, 即测定管吸光度对比照管吸光度低, 则底物工作液的配制:
底物贮备液:蒸馏水=1:99 稀释, 现用现配。
 - ② 若您的样本为产生羟自由基*, 即测定管吸光度对比照管吸光度高, 则底物工作液的配制:
底物贮备液:蒸馏水=1:299 稀释, 现用现配。注*: 抑制羟自由基的物质如: 血清(浆), 各种组织匀浆液, 天然维生素等;
产生羟自由基的物质如: 中性白细胞, 某些药物, 部分植物提取物等。
- 试剂 C 工作液的配制: C-1 工作液(试剂 C-1 用时加蒸馏水 1:9 稀释成工作液, 2-8°C 保存)与 C-2 液等比例混合, 用多少配多少, 余下 2-8°C 保存。
- 试剂 D 用时加蒸馏水稀释至 100ml, 得试剂 D 工作液, 2-8°C 保存。
如结晶, 则置 37°C 水浴中至全部溶解后再稀释。
- 显色剂的配制: 试剂 D 工作液:试剂 E:试剂 F:冰乙酸=8:3:3:2, 需多少配多少, 现用现配。

三、操作步骤

以上配制好的工作液，在 37℃ 水浴中预热 3 分钟，以下操作在 37℃ 水浴中进行：

	标准空白管	标准管	对照管	测定管
蒸馏水 (ml)	0.4	0.2	0.2	
0.03% H ₂ O ₂ 标准工作液 (ml)		0.2		
底物工作液 (ml)			0.2	0.2
样本*(ml)				0.2
试剂 C 工作液 (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4

混匀，37℃ 反应 1 分钟，加完试剂 C 开始计时一分钟，立即加入显色剂终止反应，一次只能做一只管子。

显色剂 (ml)	2	2	2	2
----------	---	---	---	---

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

*：参考取样量：血清（浆）样本用生理盐水 20 倍稀释后取 0.2ml 作检测；或直接取 10μL 血清（浆），再加 190μL 生理盐水。0.5% 组织样本，取 0.2ml 检测。具体取样量需您自己做预试确定，详细预试方法见附件。

四、计算方法及举例：

(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：

$$\text{抑制羟自由基能力}(U/ml) = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度} (8.824mM) \times \frac{1(ml)}{\text{样本取样量}(ml)} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

3. 计算举例：

取用生理盐水 20 倍稀释后的血清 0.2ml 检测抗活性氧能力，测得对照管吸光度 OD 值为 0.671，测定管吸光度 OD 值为 0.349，标准管吸光度 OD 值为 0.443，空白管吸光度 OD 值为 0.001，标准 H₂O₂ 浓度为 8.824mmol/L，则计算如下：

$$\text{抑制羟自由基能力}(U/ml) = \frac{0.671 - 0.349}{0.443 - 0.001} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 20 = 642.83U/ml \text{血清}$$

(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 浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2. 公式：

$$\text{抑制羟自由基能力}(U/mgprot) = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度} (8.824mM) \div (\text{蛋白毫克数}/ml \times \text{取样量})$$

3. 计算举例：

取 5% 小鼠肝组织匀浆 0.1ml 用生理盐水 10 倍稀释成 0.5% 肝匀浆，取 0.2ml 检测，测得对照管 OD 为 0.843，测定管 OD 为 0.418，标准管 OD 为 0.434，标准空白 OD 为 0.007，标准浓度为 8.824mmol/L，0.5% 小鼠肝匀浆的蛋白为 0.486mg/ml。

$$\text{抑制羟自由基能力}(U/mgprot) = \frac{0.843 - 0.418}{0.434 - 0.007} \times 8.824 \div (0.486 \times 0.2) = 90.36U/mgprot$$

(三) 溶血液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 浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2. 公式：

$$\text{抑制羟自由基能力(U/mgHb)} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度 (8.824mM)} \times \frac{1(\text{ml})}{\text{样本取样量(ml)}} \times \text{样本测试前稀释倍数} \div \text{血红蛋白含量(mgHb/ml)}$$

3. 计算举例:

取抗凝红细胞 0.2ml 加蒸馏水 0.8ml, 漩涡混匀器充分混匀 1 分钟制得溶血液, 同时测定血红蛋白为 41.182mgHb/ml。取 0.01ml 溶血液加 5.99ml 双蒸水, 充分混匀后取 0.2ml 按操作表进行检测, 测得对照管 OD 为 0.837, 测定管 OD 为 0.648, 标准管 OD 为 0.504, 标准空白 OD 为 0.016, 标准浓度为 8.824mmol/L, 则计算结果为:

$$\text{抑制羟自由基能力(U/mgHb)} = \frac{0.837 - 0.648}{0.504 - 0.016} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 600 \div 41.182 = 248.96\text{U/mgHb}$$

(四) 产生羟自由基能力的计算:

1. 定义: 规定每毫升、每毫克或每立方厘米内 10^6 个细胞在本反应体系中使反应液中 H_2O_2 浓度增加 1mmol/L 为一个产生羟自由基能力单位。

2. 公式:

$$\text{产生羟自由基能力(U/ml)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{对照管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度 (8.824mM)} \times \frac{1(\text{ml})}{\text{样本取样量(ml)}} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

3. 计算举例:

某种药物稀释 10 倍后取 0.2ml 检测, 结果如下: 标准空白管 OD 为 0.009, 标准管 OD 为 0.440, 测得对照管 OD 为 0.217, 测定管 OD 为 0.621。则计算如下:

$$\text{产生羟自由基能力(U/ml)} = \frac{0.621 - 0.217}{0.440 - 0.009} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 10 = 413.56\text{U/ml}$$

五、注意事项:

1. 必须每一管子单独做, 并且反应时间一分钟一定要准确。
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, 蒸馏水, 醋酸, 无水乙醇, 但不能为磷酸缓冲液。
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。

附件： 羟自由基最佳取样浓度及最佳取样量预试验方法

一. 样本处理：

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）0.1ml 按血清（浆）的测定操作进行测定。
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等稀释成 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 按组织的测定操作进行检测。

二. 操作步骤举例：

（一） 血清（浆）最佳取样浓度及最佳取样量预试验方法举例：

1. 样本：以正常组大鼠眼眶取全血，肝素抗凝血浆测活性氧为例。
2. 样本稀释：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）的测定操作进行测定。
3. 操作表：

	标准空白管	标准管	对照管	测定管
蒸馏水 (ml)	0.4	0.2	0.2	
0.03% H ₂ O ₂ 标准应用液 (ml)		0.2		
试剂 B (底物工作液) (ml)			0.2	0.2
样本*(ml)				0.2
试剂 C (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4

混匀，37℃ 反应 1 分钟，加完试剂 C 开始计时一分钟，立即加入显色剂终止反应，一次只能做一只管子。

显色剂 (ml)	2	2	2	2
----------	---	---	---	---

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

4. 预试结果：

	空白	标准	对照	1:1	1:4	1:9	1:19	1:49	1:99
吸光度值	0.001	0.443	0.671	0.090	0.113	0.161	0.349	0.579	0.633
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（ $\text{抑制率} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \times 100\%$ ）在 45%~55% 之间

的最佳取样浓度为 1:19。

取 1:19 稀释正常组大鼠血浆 0.2ml 进行羟自由基正式检测。

三. 讨论

在您进行正式检测前，需要从每组中取 2~3 个样本进行上面的预试实验，确定最佳浓度和最佳取样量。在保证抑制率（ $\text{抑制率} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \times 100\%$ ）在 20~50% 间的同时，每组之间也应该

有所差异，如果您有疑问，则需要重新摸索最佳浓度和最佳取样量。

凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

细胞凋亡

一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase(2、3、6、8、9)系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）
- TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒
- DNA Ladder 检测试剂盒

二、细胞凋亡相关抗体

三、凋亡诱导剂、抑制剂

四、氧化应激损伤检测试剂盒

五、细胞凋亡研究辅助试剂

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

细胞染色产品

亚细胞组分制备