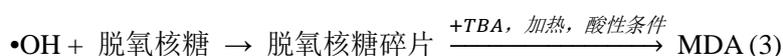
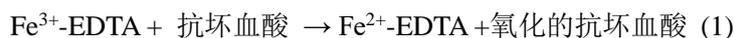


# 羟基自由基清除能力测试试剂盒

(A004-96T)

## 一、测定原理

金属离子与过氧化氢通过 Fenton 反应生成的羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ),  $\cdot\text{OH}$  攻击脱氧核糖并破坏其环呋喃环生成丙二醛 (MDA)。丙二醛与 2-硫代巴比妥酸 (TBA) 结合后在 532nm 处具有最大吸收峰 (Halliwell 等, 1987, ANAL BIOCHEM)。具体反应如下:



专一的羟基自由基抗氧化剂能减少羟基对脱氧核糖的攻击, 从而减少 MDA 产生而使发色体减少。通过测定反应终产物的吸光值即可判断受测样品的羟基自由基清除能力。

## 二、试剂组成

试剂一: 液体, 2mL;

试剂二: 液体, 2mL;

试剂三: 液体, 2mL;

试剂四: 液体, 2mL;

试剂五 A: 液体, 100mL;

试剂五 B: 淡黄色粉末;

试剂六: 液体, 100mL;

标准品: 体系终浓度为 10mM 的甘露醇 (双蒸水配制), 10mL。

## 三、储存条件及有效期

试剂盒-20°C可保存 3 个月。

## 四、试剂的配制

**试剂一应用液:** 待试剂融化后, 在试剂一瓶中加入 18mL 双蒸水, 摇匀待用;

**试剂二应用液:** 待试剂融化后, 在试剂二瓶中加入 18mL 双蒸水, 摇匀待用;

**试剂三应用液:** 待试剂融化后, 在试剂三瓶中加入 18mL 双蒸水, 摇匀待用;

**试剂四应用液：**待试剂融化后，在试剂四瓶中加入 18mL 双蒸水，摇匀待用；

**试剂五应用液：**待试剂五 A 融化后，将试剂五 B 全部倒入试剂五 A 中，充分摇匀溶解（若发现不好溶解，可超声波助溶或适当加热。如不易观察是否全部溶解，可将试剂五 A 倒入烧杯中，配制好后再倒回试剂五 A 瓶内，避光保存）；

**试剂六：**直接使用；

**标准液：**根据实际需要，采用双蒸水稀释使用。

**所有试剂均需现配现用！**

## 五、操作步骤

	样品对照孔 <sup>1</sup>	样品测定孔	空白孔
样品溶液（ $\mu\text{L}$ ）	200	200	
双蒸水（ $\mu\text{L}$ ）	200		200
试剂一应用液（ $\mu\text{L}$ ）		200	200
试剂二应用液（ $\mu\text{L}$ ）	200	200	200
试剂三应用液（ $\mu\text{L}$ ）	200	200	200
试剂四应用液（ $\mu\text{L}$ ）	200	200	200

充分混匀，37℃水浴 30min 使之充分反应。

	样品对照孔	样品测定孔	空白孔
试剂六（ $\mu\text{L}$ ）	1000	1000	1000
试剂五应用液（ $\mu\text{L}$ ）	1000	1000	1000

充分混匀，100℃沸水浴 15min<sup>2</sup>。

冷却后进行比色读数。如您具有可以测定 532nm 处吸光值的酶标仪，可从反应液中取出 200 $\mu\text{L}$  于酶标板内采用酶标仪读数；或者您也可以采用分光光度计测定 532nm 处吸光值。

<sup>1</sup>如样品颜色较浅可不做样品空白（即认为值为 0）；

<sup>2</sup>建议反应 15min，也可适当延长或缩短时间至 10-20min，但同一批样品加热时间需保持一致。

## 六、计算公式

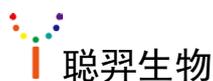
羟基自由基清除能力（%）

$$= \frac{\text{空白孔吸光值} - (\text{样品测定孔吸光值} - \text{样品对照孔吸光值})}{\text{空白孔吸光值}} \times 100$$

注：如未做对照孔，可以将其视作为 0；

## 七、注意事项

1. 如样品中色素物质不是分析对象，建议先进行脱色处理，处理后样品可不作对照孔；
2. 如不确定样品的羟基自由基清除能力，可先做不同浓度的稀释液进行摸索，并选择适宜浓度进行测定，高浓度下，浓度与清除率间并不线性相关。注意，产物的不同自由基清除能力可能相差很大，可能一个化合物的超氧阴离子自由基清除能力特别好，IC50 可以低于 10 $\mu$ g/mL，但羟基自由基清除能力很差，IC50 达到 10mg/mL，或者根本没有清除能力；
3. 混匀很重要，建议每加一种试剂时均充分混匀。
4. 100 $^{\circ}$ C 沸水浴可采用水浴锅或者电磁炉进行加热。加热时可用锡纸盖住试管管口，并用牙签戳一个小孔。若使用一次性离心管进行实验，切记不可将上盖盖死，气体膨胀有爆裂危险！
5. 加样顺序不可颠倒！不可将试剂一至四混匀后加入样品；
6. 本测试盒部分试剂对皮肤有一定伤害，请戴手套操作。在沸水浴时小心蒸汽烫伤；
7. 煮沸加热时间和温度对本测试至关重要，请务必保证所有测试管加热时间和温度均相同。同时请务必等待样品冷却到室温时再进行读数测定，如需快速冷却，可采用自来水冲洗试管外壁的方法；
8. 测定羟基自由基的方法种类繁多（Halliwell 等，1988，Methods of Biochemical Analysis），同一样品采用不同方法测定时会有一定差异，因此不同方法测定的结果不能简单比较；
9. **本测试样品一般不可采用有机溶剂溶解！**极少量也不可以！常见的有机溶剂如乙醇等，其通过本方法得到的羟基自由基清除率极高，超过许多常见抗氧化剂，不可以忽略。不可使用的有机溶剂及机理参见文献：Xican Li, 2013, Food Chemistry.



上海琮益科技有限公司

官方网站：[www.congyibio.com](http://www.congyibio.com)

技术支持：[info@congyi-tech.com](mailto:info@congyi-tech.com)



图形及“聪羿生物<sup>®</sup>”均为上海琮益科技有限公司注册商标。