

羟自由基(OH·)测定试剂盒说明书

(货号: A018-1-1 比色法 50管/48样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

注意: 本试剂盒是用于测定抑制或产生羟自由基能力的, 并非用于测定样本羟自由基含量, 望用户多注意。

一、测定原理:

Fenton 反应是最常见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, 用 griess 试剂显色, 形成红色物质, 其呈色与 OH 的多少成正比关系。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 3% H₂O₂ 标准品贮备液 0.5mL×1 支, 4℃ 保存。标准品应用液的配制: 3% H₂O₂ 标准贮备液: 蒸馏水 = 1:99 稀释, 现用现配。

试剂二: 底物贮备液 1mL×1 支, 4℃ 保存。

底物应用液的配制:

①、若您的样本为抑制羟自由基型 (绝大部分样本均为此型), 即测定管吸光度比对照管吸光度低, 则底物应用液的配制: 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型, 即测定管吸光度比对照管吸光度高, 则底物应用液的配制: 底物贮备液: 蒸馏水 = 1:299 稀释, 现用现配。

试剂三: 甲液 2mL×1 支, 4℃ 保存, 用时加蒸馏水按 1:9 比例配成应用液。乙液 7mL×2 支, 4℃ 保存。试剂三应用液的配制: 甲液应用液与乙液等比例混合, 用多少配多少, 余下 4℃ 保存。

试剂四: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存。用时加蒸馏水 90mL 稀释, 制备成应用液, 4℃ 保存。若有结晶, 则放置 37℃ 水浴至全部溶解后再稀释。

试剂五: 液体 30mL×1 瓶, 避光 4℃ 保存。

试剂六: 液体 30mL×1 瓶, 避光 4℃ 保存。

显色剂的配制: 试剂四应用液: 试剂五: 试剂六: 冰乙酸 = 8:3:3:2, 现用现配。

[注]: 抑制羟自由基型的物质如: 血清(浆)、各种组织匀浆液、口服液等; 产生羟自由基型的物质如: 中性白细胞、某些药物、部分植物等。

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或是酶标仪 (550±10nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 冰乙酸 (冰醋酸, 分析纯), 蒸馏水, 37℃ 水浴锅, 试管 (或 5mL 以上规格离心管), 蛋白测定试剂 (组织样本用, 本公司有售)。

四、操作步骤: (正式实验前请抽取 2 例样本进行预试, 以摸索其最佳样本浓度 (选择清除率在 40%~50% 间的样本浓度)); 配制好的底物应用液和试剂三应用液, 先在 37℃ 水浴中预温 3 分钟以上, 以下操作在 37℃ 水浴锅中进行。

	空白管	标准管	对照管	测定管
蒸馏水 (mL)	0.4	0.2	0.2	
标准品应用液 (mL)		0.2		
底物应用液 (mL)			0.2	0.2
样本* (mL)				0.2
试剂三应用液 (mL)	0.4	0.4	0.4	0.4

在加完试剂三的同时记录时间, 迅速涡旋混匀, 37℃ 反应 1 分钟 (准确以秒表计时), 然后立即加入显色剂终止反应。

显色剂 (mL)	2	2	2	2
混匀, 室温放置 20 分钟后, 1cm 光径, 波长 550nm, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管吸光度值 A (或是每管吸出 200μL 反应液加入到 96 孔板中, 波长 550±10nm 处酶标仪读数)。				

*参考稀释比例: 血清(浆)样本用生理盐水 20 倍稀释后取 0.2mL 作检测; 若您有精确微量移液器, 可直接取 0.010mL 血清(浆), 再加 0.190mL 生理盐水。10% 组织匀浆上清, 取 0.2mL 检测。具体稀释比例需根据预试结果确定, 详细预试方法见附录。

五、计算及举例:

(一) 羟自由基清除率计算: (只算样本清除率时用)

$$\text{羟自由基清除率} (\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

(二)、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:

$$\text{抑制羟自由基能力} (U/mL) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times N$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;

V_样: 取样量, 0.2mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

例 1: 取用生理盐水 20 倍稀释后的血清 0.2mL 检测抑制羟自由基能力, 测得对照管吸光度 OD 值为 0.785, 测定管吸光度 OD 值为 0.464, 标准管吸光度 OD 值为 0.443, 空白管吸光度 OD 值为 0.003, 标准 H₂O₂ 浓度为 8.824mmol/L, 则计算如下:

$$\text{抑制羟自由基能力} (U/mL) = \frac{0.785 - 0.464}{0.443 - 0.003} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 20 = 643.75$$

(三)、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 的浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{抑制羟自由基能力} (U/mgprot) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}})$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;

V_样: 取样量, 0.2mL;

N: 样本测试前稀释倍数;

C_{pr}: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

3、计算举例:

例 1: 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 0.785, 测定管 OD 为 0.347, 标准管 OD 为 0.443, 空白 OD 为 0.003, 标准浓度为 8.824mmol/L, 0.5% 小鼠肝匀浆的蛋白为 0.486mg/mL。

$$\text{抑制羟自由基能力} (U/mgprot) = \frac{0.785 - 0.347}{0.443 - 0.003} \times 8.824 \div (0.486 \times 0.2) = 90.37U/mgprot$$

(四)、溶血液中抑制羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫克血红蛋白在 37℃ 下反应 1 分钟, 使反应体系中 H₂O₂ 的浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/rgHb)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times N \div \text{CHb}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;

V_样: 取样量, 0.2mL;

N: 样本测试前稀释倍数;

CHb: 溶血液血红蛋白浓度, mgHb/mL (Hb 指血红蛋白)。

3、计算举例:

例 1: 取抗凝红细胞 0.2mL 加冷蒸馏水 0.8mL, 旋涡混匀器充分混匀 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 蒸馏水, 充分混匀后取 0.2mL 按操作表进行检测, 测得对照管 OD 为 0.785, 测定管 OD 为 0.615, 标准管 OD 为 0.443, 标准空白 OD 为 0.003, 标准浓度为 8.824mmol/L, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{抑制羟自由基能力 (U/mgHb)} &= \frac{0.785 - 0.615}{0.443 - 0.003} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 600 \div 41.182 \\ &= 248.36 \text{ U/mgHb} \end{aligned}$$

例 2: 取抗凝红细胞 0.2mL 加冷蒸馏水 0.8mL, 旋涡混匀器充分混匀 1 分钟制得溶血液, 同时测定血红蛋白为 53.684mgHb/mL。取 0.01mL 溶血液加 5.99mL 蒸馏水, 充分混匀后取 0.2mL 按操作表进行检测, 测得对照管 OD 为 0.785, 测定管 OD 为 0.304, 标准管 OD 为 0.443, 标准空白 OD 为 0.003, 标准浓度为 8.824mmol/L, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{抑制羟自由基能力 (U/mgHb)} &= \frac{0.785 - 0.304}{0.443 - 0.003} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 600 \div 53.684 \\ &= 539.684 \text{ U/mgHb} \end{aligned}$$

(五)、产生羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫升或每毫克物质或每毫升内 10⁶ 个细胞在本反应体系中使反应液中 H₂O₂ 的浓度增加 1mmol/L 为一个产生羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{产生羟自由基能力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times N$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;

V_样: 取样量, 0.2mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

例 1: 某中药物质稀释 10 倍后取 0.2mL 检测, 结果如下: 标准空白管 OD 值为 0.003, 标准管 OD 值为 0.443, 对照管 OD 值为 0.217, 测定管 OD 值为 0.621。则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{产生羟自由基能力 (U/mL)} &= \frac{0.621 - 0.217}{0.443 - 0.003} \times 8.824 \times \frac{1}{0.2} \times 10 \\ &= 405.10 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

六、注意点:

- 1、每一管子反应时间一分钟 (从加入试剂三到加入显色剂的时间) 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, 但不能为磷酸缓冲液、甲醇、乙醇或其它有机溶剂。
- 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 倍或 10 倍稀释液等做预试。如测定管颜色太浅可将样本用其溶剂继续稀释, 直至反应后颜色较深为止。统计有实测花粉的水提液的羟自由基, 将其原液稀释 150 倍后, 显色较好。

附录: 样本最佳取样浓度摸索 (参考)

一、样本前处理:

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) 0.2mL 按操作表进行检测。

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液稀释成 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 按操作表进行检测。

二、操作步骤 (以血浆样本为例作最佳取样浓度摸索):

1、样本来源: 正常组大鼠眼眶取全血, 肝素抗凝取血浆进行测定。

2、样本稀释: 用生理盐水将血浆按 1:1、1:4、1:9、1:19、1:49、1:99 稀释成一系列不同浓度的血浆, 分别取不同浓度的血浆 0.2mL 按血清 (浆) 的测定操作表进行检测。

3、操作表:

	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		
试剂二 (底物应用液) (mL)			0.2	0.2
样本* (mL)				0.2
试剂三 (mL)	0.4	0.4	0.4	0.4
在加完试剂三的同时开始计时, 迅速混匀, 37℃ 反应 1 分钟 (准确以秒表计时), 然后立即加入显色剂终止反应。				
显色剂 (mL)	2	2	2	2
混匀, 室温放置 20 分钟后, 1cm 光径, 波长 550nm, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值。				

4、预试结果:

对照	0.785		空白	0.003	标准	0.443
稀释比例	1:1	1:4	1:9	1:19	1:49	1:99
吸光度值	0.105	0.132	0.188	0.408	0.677	0.741
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, 羟自由基清除率 ($\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$) 在 45%~55% 之间的最佳取样浓度为 1:19, 即取 1:19 稀释后正常大鼠血浆取 0.2mL 测定。

三、讨论:

在您进行正式检测之前, 需要从每组中取 2-3 个样本进行上面的预实验, 以确定最佳样本浓度或最佳取样量; 在保证羟自由基清除率 ($\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$) 在 20%-55% 之间的同时, 每组之间应该有所差异, 如有疑问, 则需重新摸索最佳样本浓度或最佳取样量。