

羟自由基 (OH⁻) 检测试剂盒

(货号: BC000 比色法)

一、测定意义及原理

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、试剂组成及配制 (48T)

		规格	储存
试剂一	3%H ₂ O ₂ 标准品贮备液	0.5ml*1 瓶	4°C 保存 3 个月
0.03%标准品应用液的配制: 3%H ₂ O ₂ 标准贮备液: 双蒸水=1 : 99 稀释.现用现配。			
试剂二	底物贮备液	1ml*1 瓶	4°C 保存 3 个月
底物应用液的配制: 、若您的样本为抑制羟自由基, 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: 双蒸水=1 : 99 稀释, 现用现配。 、若您的样本为产生羟自由基, 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: 双蒸水=1 : 299 稀释, 现用现配。			
试剂三	甲液贮备液	2ml*1 瓶	4°C 保存 3 个月
	乙液	7ml*2 瓶	4°C 保存 3 个月
甲液应用液: 甲液用时加 双蒸水 1 : 9 稀释成应用液。 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°C 保存一周			
试剂四	液体	10ml*1 瓶	4°C 保存 3 个月
试剂四应用液: 用时加双蒸水稀释至 100mL, 制备成应用液, 4°C 保存。若有结晶, 则放置 37°C 水浴至全部溶解后再稀释。			
试剂五	液体	30ml*1 瓶	避光 4°C 保存 3 个月
试剂六	液体	30ml*1 瓶	避光 4°C 保存 3 个月
试剂七	分析纯的冰乙酸 (冰醋酸) 自备。		
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]: 抑制羟自由基的物质如: 血清 (浆)、各种组织匀浆液、口服液等;
产生羟自由基的物质如: 中性白细胞、某些药物、部分植物等。



三、操作步骤:

以上配制好的应用液，先在 37°C 水浴中预温 3 分钟，以下操作在 37°C 水浴中进行。

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.4	0.2	0.2	
0.03% H ₂ O ₂ 标准应用液 (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开始计时，迅速混匀，37°C 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，550nm，双蒸水调零，测各管吸光度值 A。				

*参考取样：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 10 μl 血清（浆），再加 190 μl 生理盐水。10%组织匀浆上清，取 0.2mL 检测。具体取样浓度需根据预试结果确定，详细预试方法见附录。

四：计算及示例：

(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°C 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：

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/ml)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times \text{样本测试前稀释倍数 (N倍)}$$

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：

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



(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°C 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:

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \times \frac{\text{样本测试前稀释倍数}}{(N\text{倍})}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;

V_样: 取样量, 0.2mL;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

例 1: 取 5%小鼠肝组织匀浆 0.1 mL 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。

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mgprot)} = \frac{0.785 - 0.443}{0.347 - 0.003} \times 8.824 \div (0.486 \times 0.2) = 90.25 \text{ U/mgprot}$$

(三)、溶血液中抑制羟自由基能力的计算:

1、定义: 规定每毫克血红蛋白在 37°C 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:

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mgHb)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times \frac{\text{样本测试前稀释倍数}}{(N\text{倍})} \div \text{CHb}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 8.824mmol/L;

V_样: 取样量, 0.2mL;

CHb: 溶血液血红蛋白浓度, mgHb/mL (Hb 指血红蛋白)。

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

例 1: 取抗凝红细胞 0.2mL 加冷双蒸水 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 双蒸水 (等同于稀释了 600 倍), 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:

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



(四)、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 的浓度增加 1mmol/L 为一个产生羟自由基能力单位。

2、公式:

$$\text{产生羟自由基能力 (U/ml)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \times \text{样本测试前稀释倍数 (N倍)}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 8.824mmol/L ;

$V_{\text{样}}$: 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:

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

(五)、注意点:

- 1、每一只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、双蒸水、醋酸, 但不能为磷酸缓冲液、无水乙醇。
- 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。如测定管颜色太浅可将样本用其溶剂继续稀释至颜色较深为止。检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 I: 羟自由基最佳取样浓度及最佳取样量摸索

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 按血清 (浆) 的测定操作表进行检测。
- 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 按组织的测定操作表进行检测。

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
双蒸水 (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°C (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, 550nm, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。				

4、预实验结果:

对照	0.785		空白	0.003	标准	0.443
稀释倍数	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, 抑制率

$\left(\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}}\right) \times 100\%$ 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、请悉知:

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; 在保证抑制率 $\left(\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}}\right) \times 100\%$ 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。

