

羟自由基 (OH·) 含量试剂盒说明书

(货号: BP10050F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

羟自由基 (OH·) 是活性氧的一种。2-脱氧核糖在羟自由基 (OH·) 存在下被氧化成丙二醛类似物, 接着与硫代巴比妥酸(TBA)缩合生成有色产物, 通过测定该有色产物在 532nm 的最大吸收峰, 进而计算出羟自由基 (OH·) 含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 2 瓶	4℃ 避光保存	每瓶: 1. 若有沉淀析出, 50℃水浴至溶解; 2. 溶解后一个月内使用完毕, 可室温避光保存, 长期保存则需 4 度避光保存; 3. 保存期间若有沉淀析出可再次 50℃水浴至溶解待用。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃ ×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清液测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接测定, 若浑浊则离心后取上清液测定。

2、检测步骤

① 打开分光光度计预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 同时水浴锅或者金属浴加热到 95℃。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂一	100	300

试剂二	200	
35℃避光孵育 1 小时		
试剂三	400	400
混匀后，在 95℃水浴中保温 10min，取出放冰上冷却，25℃，观察是否浑浊，若浑浊则 12000rpm 离心 3min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 532nm 处读取吸光度 A。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$		

【注】：若 ΔA 值低于 0.005，可增加上清液体积 V_1 （如增至 200 μ L，则试剂一为 0 μ L）或增加取样质量 W （如增至 0.3g），则改变后的 W 和 V_1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量 (A} \times 1000/\text{g 鲜重)} = \Delta A \div (W \times V_1 \div V) \times 10^3 = 10 \times \Delta A \div W \times 10^3$$

2、按蛋白浓度计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量 (A} \times 1000/\text{mg Prot)} = \Delta A \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times 10^3 = 10 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times 10^3$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量 (A} \times 1000/\text{mL)} = \Delta A \div V_1 \times 10^3 = 10 \times \Delta A \times 10^3$$

4、按细菌/细胞计算：

$$\text{羟自由基 (OH}\cdot\text{) 含量 (A} \times 1000/10^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (500 \times V_1 \div V) \times 10^3 = 10 \times \Delta A \div 500 \times 10^3$$

V ---样本提取液的总体积，1 mL；

V_1 ---加入反应体系样本体积，0.1mL；

500---细胞数量，万；

W ---样本质量，g；

A ---absorbance units。

C_{pr} ---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。