活性氧（羟自由基）测定试剂盒（比色法）

产品货号：BA1789

产品规格：50T

产品简介：

Fenton反应是常用的产生羟自由基的化学反应，H_2O_2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。

产品组成：

试剂内容		规格（50T）	保存条件
试剂(A)：	标准品储存液（3% H_2O_2）	0.5ml	2-8℃
试剂(B)：	底物储存液	1ml	2-8℃
试剂(C)：	液体C-1	2ml	2-8℃
	液体C-2	7ml×2支	2-8℃
试剂(D)：	液体	50ml	2-8℃
试剂(E)：	液体	50ml	2-8℃，避光

注意：

1. 0.03%标准品工作液的配制：3%H_2O_2标准贮备液:蒸馏水=1:99稀释，现用现配。
2. 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。
3. 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℃保存）与C-2液等比例混合，用多少配多少，余下2-8℃保存。
4. 显色剂的配制：试剂D:试剂E=1:1，需多少配多少，现用现配。

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_2O_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。

扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com

*：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。

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 H_2O_2 浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。
2. 公式：

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

3. 计算举例：

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 H_2O_2 浓度为 8.824mmol/L，则计算如下：

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

（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 H_2O_2 浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。
2. 公式：

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

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。

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

（三）溶血液中抑制羟自由基能力的计算：

1. 定义：规定每毫克组织蛋白在 37℃下反应 1 分钟，使反应体系中 H_2O_2 浓度降低 1mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。
2. 公式：

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

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：

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

扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com

（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：

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

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：

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

注意事项：

1. 必须每一只管子单独做，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。

有效期：3 个月有效。

扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com

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，肝素抗凝取血浆测活性氧为例。
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_2O_2标准工作液（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（$抑制率=\frac{对照管吸光度-测定管吸光度}{对照管吸光度}\times100\%$）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（$抑制率=\frac{对照管吸光度-测定管吸光度}{对照管吸光度}\times100\%$）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。

扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com