羟自由基（OH^-）含量试剂盒说明书

（货号：G0153W 微板法 96 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×3 瓶	4℃保存	临用前每瓶依次加 9mL 蒸馏水和 9mL 乙酸混匀，可超声至完全溶解，溶解后 4℃保存（若变粉色则弃掉）。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、羟自由基（OH^-）含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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（10^4）：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、上机检测：

① 打开酶标仪预热 30min，同时水浴锅或者金属浴加热到 95℃。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
上清液	60	60
试剂一	60	180
试剂二	120	
35℃避光孵育 1 小时		
试剂三	240	240
混匀，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 12000rmp 离心 3min，取 200μL 上清液至 96 孔板中，于 532nm 处读取吸光度 A，ΔA＝A 测定-A 对照。		

【注】：若ΔA 值低于 0.005，可增加上清液体积 V1（如增至 120μL，则试剂一为 0μL）

或增加取样质量 W(如增至 0.3g)，则改变后的 W 和 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

羟自由基（OH^-）含量(A*1000/g 鲜重)=$\Delta A \div (W \times V1 \div V) \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \div W \times 10^3$

2、按细菌/细胞计算：

羟自由基（OH^-）含量(A*1000/10^4 cell)=$\Delta A \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \div 500 \times 10^3$

3、按照液体体积计算：

羟自由基（OH^-）含量(A*1000/mL)=$\Delta A \div V1 \times 10^3 = 16.7 \times \Delta A \times 10^3$

V---样本提取液的总体积，1 mL；

V1---加入反应体系样本体积，0.06mL；

500---细胞数量，万；

W---样本质量，g；

A---absorbance units。