

## 羟自由基(OH·)测定试剂盒

50管/48样

### 一、测定原理：

Fenton 反应是最常见的产生羟自由基的化学反应，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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：

试剂一：3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准品贮备液 0.5 ml×1 支，4℃保存 3 个月。0.03%标准品应用液的配制：3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准品贮备液：双蒸水=1：99 稀释，现用现配。

试剂二：底物贮备液 1ml×1 支，4℃保存 3 个月。

底物应用液的配制：

①、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。

②、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 2 ml×1 支，4℃保存 3 个月，用时加双蒸水 1：9 稀释成应用液。乙液 7 ml×2 支，4℃保存 3 个月。

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 3 个月。用时加双蒸水稀释至 100ml，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℃冰箱保存 3 个月。

试剂六：液体 30ml×1 瓶，避光 4℃冰箱保存 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℃水浴中预温 3 分钟，以下操作在 37℃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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 标准应用液 (ml)		0.2		
底物应用液 (ml)			0.2	0.2
样本* (ml)				
试剂三应用液 (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4
混匀，37℃反应 1 分钟（准确以秒表计时），从加完试剂三开始到一分钟结束，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，1 cm 光径，550nm，双蒸水调零，测各管吸光度值。				

\*：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；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。组织匀浆上清，取样 0.2ml 检测。具体取样量需根据预试结果确定，详细预试方法见附录。

#### 五、注意点：

- 1、必须每一管子单独做，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、双蒸水、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。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。我所曾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。