

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY005-48 微板法 48样)

有效期: 3个月

注意: 正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

研究意义:

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药学研究中 常常检测血浆、血清、唾液、尿液等各种体液, 细胞或组织等裂解液、植物或中草药抽提液 及各种抗氧化物(antioxidant)溶液的总抗氧化能力。

测定原理:

在酸性环境下, 抗氧化物质还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 的能 力反映了总抗氧化能力。

自备实验用品:

恒温水浴锅、低温离心机、酶标仪、 无水乙醇、96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体60mL×1瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体10mL×1瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体1mL×1瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三: 液体1mL×1瓶, 4℃ 避光保存。

标准品: 粉末4mg×1支, 4℃ 保存。

混合液(现配现用): 将试剂一、试剂二、试剂三按10:1:1的比例混合, 使用前37℃ 预温。

样品的制备:

(1) 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

血浆(制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝, 不宜使用 EDTA 抗凝)4℃, 5000rpm 离心 10min, 取上清待测。血清、唾液或尿液样品直接用于测定, 也可以-80℃冻存(不宜超过 30 d)后再测定。

(2) 组织样品

按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液)进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

(3) 细菌、细胞样品

按照细菌、细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细菌、细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎(功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

操作步骤:

1、酶标仪预热 30min, 调节波长至 593nm。

2、Trolox标准曲线的制备: 称取2mg标准品即Trolox至一新EP管, 再加2mL乙醇溶解充分溶解, 即4μmol/mL标准品, 备用。取4μmol/mL的Trolox标准液用提取液稀释成不同浓度: 0μmol/mL、0.4μmol/mL、1.2μmol/mL、2.0μmol/mL、2.8μmol/mL、3.6 μmol/mL进行标准曲线的制备。

浓度	Trolox (μl)	提取液 (μl)
0 μmol/mL	0	50

0.4 μmol/mL	5	45
1.2 μmol/mL	15	35
2.0 μmol/mL	25	25
2.8 μmol/mL	35	15
3.6 μmol/mL	45	5

按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。

3、操作表

	对照管	测定管
混合液 (μL)	180μL	180μL
样品 (μL)		6μL
双蒸水 (μL)	24μL	18μL
充分混匀，反应10min，双蒸水调零，微量石英比色皿/96孔板，测定593nm吸光值。 ΔA= OD测定-OD对照（注：对照管只需测定一次）。		

注意：

- 1、空白管只需测定一次，若测定管吸光值大于 1.5 则需要用提取液稀释。
- 2、若ΔA的值在零附近，可增加样本量V样（如增至15 μL，则蒸馏水相应减少），则改变后的V样需代入公式重新计算。

结果计算：

标准曲线的绘制 以Trolox质量 (0nmol、2.4nmol、7.2nmol、12nmol、16.8nmol、21.6 nmol) 为x轴，以其对应的ΔA (ΔA= OD测定-OD对照) 为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA测定带入公式中得到x (nmol)。

单位定义：用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的总抗氧化能力。

(1) 按血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

$$\text{总抗氧化能力 (}\mu\text{mol/ml)} = (\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div V_{\text{样}} \times D$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{总抗氧化能力 (}\mu\text{mol/g 鲜重)} = (\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times D$$

(3) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{总抗氧化能力 (}\mu\text{mol/mg prot)} = (\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times D$$

(4) 按照细菌、细胞数量计算

$$\text{总抗氧化能力 (}\mu\text{mol}/10^4\text{ cell)} = (\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div (V_{\text{样}} \div 500 \times W) \times D$$

V 样总：加入提取液体积，1.0 mL；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数，万；V样：反应中样品体积，5 μL=0.005 mL；D：稀释倍数，未稀释即为1。

注意事项：

1. 试剂二对人体有刺激性，请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 尽量避免使用在酸性条件下呈蓝色或接近蓝色的试剂，否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
3. 样品中不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂和 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的还原剂。