

ABTS 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-F-AB001 分光法 48 样)

一、产品简介:

ABTS 是一种介体物质, 用 $K_2S_2O_8$ 与 ABTS 直接生成稳定的阳离子自由基 $ABTS^+$, 抗氧化物质与 $ABTS^+$ 发生反应而使反应体系褪色。

$ABTS^+$ 自由基离子的最大吸收波长为 734nm, 所以, 用 734 nm 可以检测 $ABTS^+$ 自由基离子的浓度。如果 734nm 减小, 表明 $ABTS^+$ 自由基离子被清除, 进而对样本中 ABTS 清除能力进行定量分析。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 3 支	4°C 保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 每支加 0.49mL 蒸馏水溶解 (溶解后一周内用完)。
试剂二	粉剂 1 支	4°C 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 2.86mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

工作液配置: 临用前将加水溶解后的试剂一和试剂二按照 1:1 比例混合, 避光反应 12h 后 (二天内用完), 再用无水乙醇稀释 20-30 倍备用 (使 A 空白管在 1.0 ± 0.2 , 用乙醇稀释后的液体即工作液最好现配现用)。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵、甲醇、无水乙醇和蒸馏水。

四、ABTS 自由基清除能力测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 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 0.1g 新鲜组织或者称取约 0.05g 烘干样本 (将样本在 105°C 下杀青 3min, 然后 60°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 得到烘干样本), 加入 1mL 的 80% 甲醇提取液 (若鲜样需研磨均质), 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次), 若有损失需用 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【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 500 万细菌或细胞加入 1mL 的 80% 甲醇提取液进行匀浆; 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次), 若有损失需用 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm, 离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4 个): 提取液 (mL) 为 1000~5000: 1 比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 734nm, 无水乙醇调零。

② 不同样本清除能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 若 A 测定-A 对照接近零, 需对样本进行稀释 (用 80% 甲醇提取液稀释) 后再检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。

③ 在 EP 管中依次加入:

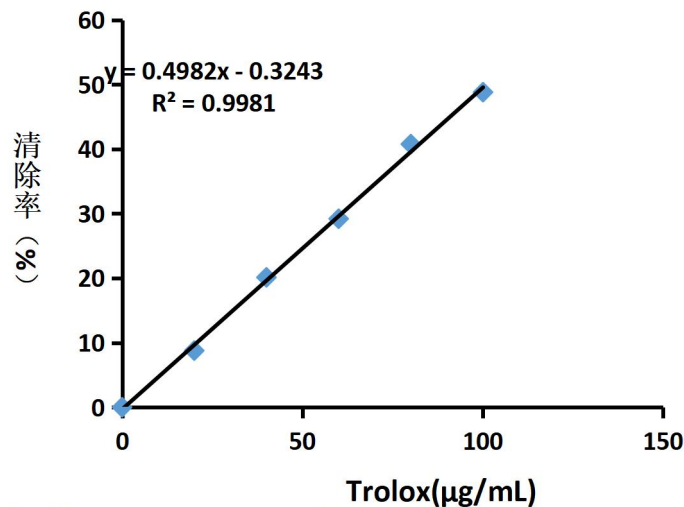
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	50	50	
无水乙醇		950	50
工作液	950		950

混匀, 室温 (25°C) 避光静置 6min, 转移全部液体至玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 734nm 处读取吸光值 A。

【注】若一次性样本较多, 可用排枪或者分批检测, 以使测定管的反应时间 (避光静置 6min) 保持一致。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.4982x - 0.3243$, x 是标准品 Trolox 质量 ($\mu\text{g/mL}$), y 是清除率 (%)。



2、ABTS 自由基清除率 (%) = $[(1 - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div A_{\text{空白}}) \times 100]\%$

3、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 ABTS 自由基清除能力。

4、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{ABTS 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) &= [(清除率 + 0.3243) \div 0.4982 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 2 \times (清除率 + 0.3243) \div W \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{ABTS 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 + 0.3243) \div 0.4982 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D$$

5、按细菌或细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{ABTS 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(清除率 + 0.3243) \div 0.4982 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 2 \times (清除率 + 0.3243) \div 500 \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{ABTS 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = [(70 + 0.3243) \div 0.4982 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

6、液体样本:

$$\begin{aligned} \text{ABTS 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/mL}) &= [(清除率 + 0.3243) \div 0.4982] \times D \\ &= 2 \times (清除率 + 0.3243) \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{ABTS 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/mL}) = [(70 + 0.3243) \div 0.4982] \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, $50\mu\text{L} = 0.05 \text{ mL}$;

W---样品质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

Trolox 分子量---250.29;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管，再加 2mL 甲醇充分溶解，即 1mg/mL 标准品，备用。
- 2 把母液用甲醇稀释成以下浓度梯度的标准品：0，20，40，60，80，100 μ g/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。