

总抗氧化能力 (T-AOC) (FRAP 法) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-KY005-48 分光法 48 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

FRAP 法常用于血浆、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、或各种抗氧化物溶液的总抗氧化能力的检测。即在酸性环境下, 抗氧化物可以还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ, 随后在 590nm 测定蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 即可获得样品中的总抗氧化能力。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂二	液体 4.5mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂三	液体 4.5mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

①组织样本:

称取 0.1g 样本 (若是干样可取 0.02-0.05g), 加入 1mL 的 80%乙醇 (自备) 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)。12000rpm, 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

②液体样本: 水溶性样本可直接检测。若是油性样本, 可用 80%乙醇溶解后再取上清检测。

③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%乙醇 (自备) 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); 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。

2、检测步骤:

① 可见分光光度计预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 590nm, 蒸馏水调零。

② 显色液配置: 将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合, 使用前 37°C预温, 现配现用, 注意避光。

③ 不同样本抗氧化能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 若 A 测定超过 1.8, 需对样本用 80%乙醇稀释, 稀释倍数 D 代入公式计算。

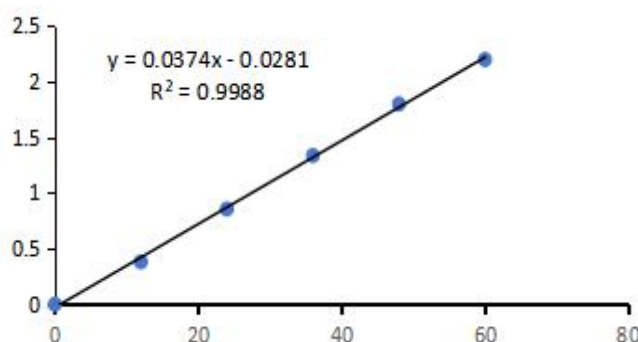
④ 在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	75	0
蒸馏水	75	150
显色液	850	850
混匀后, 室温 25°C, 准确反应 10min, 于 590nm 处读取吸光值 A; $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】若 ΔA 的值在零附近, 可增加样本量 V_1 (如增至 15μL, 则蒸馏水相应减少), 则改变后的 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0374x - 0.0281$, x 是标准品 Trolox 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、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。

3、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0281) \div 0.0374 \times 10^{-3}] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0281) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0281) \div 0.0374 \times 10^{-3}] \div (V_1 \div V \times C_{pr}) \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0281) \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

5、液体样本计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.0281) \div 0.0374 \times 10^{-3}] \div V_1 \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0281) \times D \end{aligned}$$

6、按细菌或细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0281) \div 0.0374] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.713 \times (\Delta A + 0.0281) \times D \end{aligned}$$

V ---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---反应中样品体积, 75μL=0.075 mL;

W ---样品质量, g;

Trolox 分子量---250.29;

D ---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细菌或细胞总数, 万。

C_{pr} ---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

【注意】:

1. 由于本方法是显蓝色测定吸光值, 因此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。
2. 样本中不宜添加 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。

3. 如果样品测定出来的吸光值在标准曲线范围以外，需把样品适当稀释或浓缩后再进行测定。
4. 若样本处理过程中施加了较高浓度的铁盐或亚铁盐会干扰测定，不宜用本测试方法。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液 ($4\mu\text{mol/mL}=4\text{nmol}/\mu\text{L}$)：称取 2mg 标准品至一新 EP 管，再加 2mL 乙醇充分溶解，即得到 $4\mu\text{mol/mL}$ 标准品母液；
- 3 将母液用乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8, 3.6 nmol/ μL 即 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.4	1.2	2.0	2.8	3.6
标品母液 μL	0	20	60	100	140	180
乙醇 μL	200	180	140	100	60	20
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，计算各标品的清除率%，以标准品 Trolox 摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 为 x， ΔA 为 y，过 0 点制作标准曲线。

在离心管中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标准品	75	
乙醇		75
蒸馏水	75	75
显色液	850	850
混匀后，室温 25°C ，准确反应 10min，全部转移至 1ml 比色皿中，于 590nm 处读取吸光值 A； $\Delta A=A_{\text{标准}}-A_0$ 浓度；		