

铁离子还原能力（ferric reducing ability of plasma）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-KY014 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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 即可获得样品中的铁离子还原能力，吸光值越高表示样品的还原能力越强。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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℃, 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/培养细胞：

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，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 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 590nm。

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℃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 1.5，需对样本用 80%乙醇稀释，稀释倍数 D 代入公式计算。

④ 在 96 孔板中依次加入：

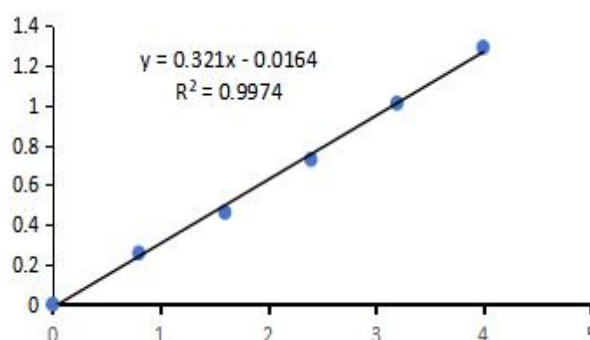
试剂组分（μL）	测定管	空白管（只做一次）
样本	5	0
蒸馏水	25	30

显色液	170	170
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】1. 若 A 测定值超过 1.5，可对样本用提取液进行稀释，或减少样本上样量 V1（如减至 2μL，则提取液增至 28μL），则稀释倍数 D 或加样量 V1 需代入公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值在零附近，可增加样本量 V1（如增至 15μL，则蒸馏水相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.321x - 0.0164，x 是标准品（FeSO₄）摩尔浓度（μmol/mL），y 是 ΔA 。



2、组织样本：

(1) 按样本质量计算：

$$\text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.321 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ = 3.11 \times (\Delta A + 0.0164) \div W \times D$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.321 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \times D \\ = 3.11 \times (\Delta A + 0.0164) \div Cpr \times D$$

3、液体样本：

$$\text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.321 \times V1] \div V1 \times D \\ = 3.11 \times (\Delta A + 0.0164) \times D$$

4、细菌/细胞样本

$$\text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.321 \times V1] \div (V1 \div V \times 500 \times D) \\ = 0.0062 \times (\Delta A + 0.0164) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---反应中样品体积，5μL=0.005 mL；

W---样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细菌或细胞总数，万

Cpr---样本蛋白浓度，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. 如果样本中处理过程中施加了较高浓度的铁盐或亚铁盐，会干扰测定，不宜使用本测试方法

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（100 μ mol/mL）：临用前加 1mL 蒸馏水，充分溶解混匀；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 μ 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：

吸取标准品母液 50uL，加入 1.2ml 蒸馏水，混匀得到 4 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.8	1.6	2.4	3.2	4
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	5	
蒸馏水	25	30
显色液	170	170
混匀后，室温 25 $^{\circ}$ C，准确反应 10min，于 590nm 处读取吸光值 A； $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$		