

总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒说明书（ABTS 法）

（货号：ADS-W-YHKY004-96 微板法 96 样）

一、指标介绍：

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 $ABTS^+$ ，在抗氧化物存在时 $ABTS^+$ 的产生会被抑制，在 734nm 或 414nm 测定 $ABTS^+$ 的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种维生素 E 的类似物，具有和维生素 E 相近的抗氧化能力，用作其它抗氧化物总抗氧化能力的参考。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.49mL 蒸馏水，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.45mL 蒸馏水，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 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。

工作液配置：1. 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），再稀释 20-40 倍备用（使 A 空白管在 1.0 ± 0.2 ）；
2. 当待检测样品为水溶性样品时，用 PBS 或蒸馏水稀释；
3. 当待检测样品为非水溶性样品时，用 80%乙醇或无水乙醇稀释（最好现配现用）。

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、无水乙醇、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！

注：样品中不能添加 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的物质，也不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂。

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 的冷 PBS（水溶性样本）或 80%乙醇（非水溶性样本），进行冰浴匀浆，匀浆后转入离心管中。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【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 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

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 冷 PBS 或 80%乙醇进行匀浆；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），若有损失需用 PBS 或 80%乙醇定容至 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。

2、检测步骤：

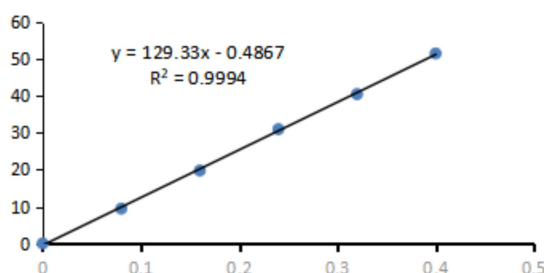
- ① 酶标仪预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 414nm。
- ② 不同样本清除能力不一，**可先选取 2 个样本做检测**，若 A 测定-A 对照接近零，需对样本进行稀释（稀释液与组织提取液一致，即水溶性样本用 PBS 或蒸馏水稀释，非水溶性样本用 80%乙醇稀释）后再检测，稀释倍数 D 代入公式计算。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（ μL ）	测定管	对照管	空白管（做一次）
样本	10	10	
PBS 或 80%乙醇		190	10
工作液	190		190
混匀，室温（25℃）避光静置 6min，于 414nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ 。			

【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： $y = 129.33x - 0.4867$ ，x 是标准品 Trolox 摩尔浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.4867) \div 129.33 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A + 0.4867) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.4867) \div 129.33 \times V1] \div (V1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A + 0.4867) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

4、液体体积：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.4867) \div 129.33 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A + 0.4867) \times D \end{aligned}$$

5、按细胞/细菌数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.4867) \div 129.33 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A + 0.4867) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

W---样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

V1---反应中样品体积，10 μL =0.01 mL；

Trolox 分子量---250.29；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒

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 ($4\mu\text{mol/mL}$) : 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, 0.04, 0.08, 0.16, 0.24, $0.32\mu\text{mol/mL}$ 。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:

吸取标准品母液 100uL, 加入 1.15ml 乙醇, 混匀得到 $0.32\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.04	0.08	0.16	0.24	0.32
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
乙醇 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, 计算各标品的清除率%, 以标准品 Trolox 质量 ($\mu\text{mol/ml}$), y 清除率%, 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
无水乙醇		10
工作液	190	190
混匀, 室温 (25°C) 避光静置 6min, 于 414nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_0 \text{ 浓度} - A \text{ 标准}$ 。		