

总抗氧化能力（T-AOC）（FRAP 法）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-KY005-48 微板法 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+} -三吡啶三吡啶(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	注意事项
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 0.8mL×1 支	4℃避光保存	
试剂三	液体 0.8mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉体 mg×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、总抗氧化能力测定：

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/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℃，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 酶标仪预热 30min（等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：

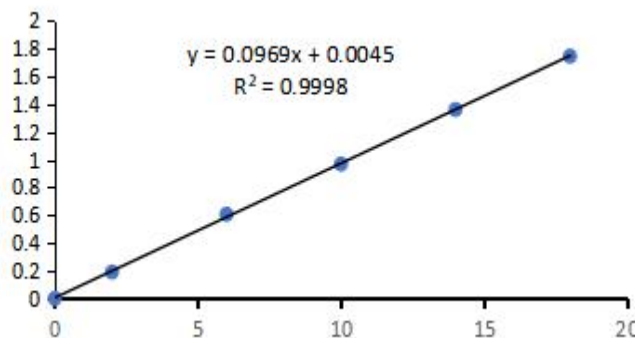
试剂组分（μL）	测定管	空白管（只做一次）
样本	5	0

蒸馏水	25	30
显色液	170	170
混匀后，室温 25℃，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 V1（如增至 15 μL ，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： $y = 0.0969x + 0.0045$ ，x 是标准品 Trolox 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：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0045) \div 0.0969 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 2.064 \times (\Delta A - 0.0045) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0045) \div 0.0969 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times Cpr) \times D \\ &= 2.064 \times (\Delta A - 0.0045) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

5、液体样本：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A - 0.0045) \div 0.0969 \times 10^{-3}] \div V1 \times D \\ &= 2.064 \times (\Delta A - 0.0045) \times D \end{aligned}$$

6、按细菌或细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0045) \div 0.0969] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 4.13 \times (\Delta A - 0.0045) \times D \end{aligned}$$

V----加入提取液体积，1 mL； V1----反应中样品体积，5 μL =0.005 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。

Cpr---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. 如果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 ($4\mu\text{mol/mL}=4\text{nmol}/\mu\text{L}$)：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 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标准品	5	
乙醇		5
蒸馏水	25	25
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； $\Delta A=A_{\text{标准}}-A_0$ 浓度；		