

## 总还原力试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY026-196 微板法 196 样 有效期: 9 个月)

### 一、指标介绍:

总还原力是评估物质中还原性成分含量的综合指标, 主要用于测定其抗氧化能力或还原潜力。该指标通过定量分析样品中能提供电子的物质总量, 为环境监测、食品工业及生物化学研究提供关键数据支持。

样品将铁氰化钾还原成亚铁氰化钾, 亚铁氰化钾再与三氯化铁反应生成普鲁士蓝, 随后在 700nm 测定普鲁士蓝的吸光度即可获得样品中的总还原力。

### 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                                                                                           |
|------|--------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 110mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                                                |
| 试剂一  | 液体 4mL×1 瓶   | 4℃保存   |                                                                                                |
| 试剂二  | 粉剂×1 瓶       | 4℃避光保存 | 1. 开盖前可用动几下, 使粉剂落入容器底部;<br>2. 临用前加入 10mL 水充分溶解备用;<br>3. 溶解后的试剂与试剂盒有效期相同(注意保存期间留意是否变色, 变色不能使用)。 |
| 试剂三  | 液体 8mL×1 瓶   | 4℃保存   |                                                                                                |
| 试剂四  | 液体 4mL×1 瓶   | 4℃避光保存 |                                                                                                |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃保存   | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>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 孔酶标板、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 的提取液进行匀浆, 匀浆后转入 2mL 离心管中 12000rpm, 室温离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

##### 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 的提取液进行匀浆; 匀浆后转入 2mL 离心管中 12000rpm, 室温离心 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: 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。

#### 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 700nm, 蒸馏水调零。

② 在离心管中依次加入：

| 试剂名称 (μL)                          | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|------------------------------------|-----|------------|
| 样本                                 | 30  |            |
| 提取液                                |     | 30         |
| 试剂一                                | 40  | 40         |
| 试剂二                                | 40  | 40         |
| 混匀，于 50℃水浴 20min                   |     |            |
| 试剂三                                | 40  | 40         |
| 混匀，5000rpm 室温离心 5min，取出全部上清液待下一步反应 |     |            |

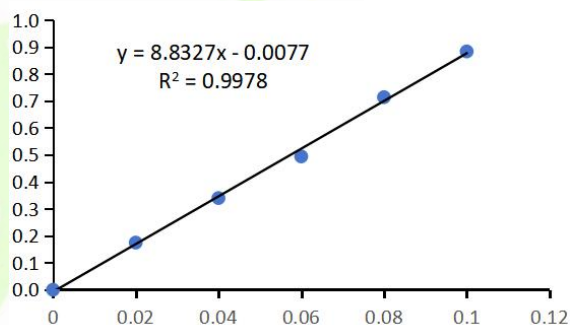
③ 显色反应：

| 试剂名称 (μL)                                                                     | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|------------|
| 上清液                                                                           | 90  | 90         |
| 水                                                                             | 90  | 90         |
| 试剂四                                                                           | 20  | 20         |
| 混匀，室温反应 10min，于 700nm 处读取吸光值 A，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ |     |            |

【注】若  $\Delta A$  的值在零附近，可增加样本量  $V_1$ （如增至 50μL 或更多，则试剂一相应减少），或增加取样浓度，则改变后的  $V_1$  和  $W$  需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线：  $y = 8.8327x - 0.0077$ ，  $x$  是标准品浓度 (mg/mL)，  $y$  是  $\Delta A$ 。



2、定义：用从标准曲线上获得的抗氧化剂的量来表示样本的总还原力。

3、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总还原力}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 8.8327 \times V_1 \times 10^3] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 113.22 \times (\Delta A + 0.0077) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总还原力}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 8.8327 \times V_1 \times 10^3] \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 113.22 \times (\Delta A + 0.0077) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

5、液体样本计算：

$$\begin{aligned} \text{总还原力}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.0077) \div 8.8327 \times V_1 \times 10^3] \div V_1 \times D \\ &= 113.22 \times (\Delta A + 0.0077) \times D \end{aligned}$$

6、按细菌或细胞数量计算：

$$\text{总还原力}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0077)\div 8.8327\times V_1\times 10^3]\div (V_1\div V\times 500)\times D$$

$$=0.2264\times (\Delta A+0.0077)\times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---反应中样品体积, 30μL=0.03 mL;

W---样品质量, g; 500---细菌或细胞总数, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

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 (1mg/mL): 在标准管中直接加入 2mL 纯水充分溶解, 即 1mg/mL 标准品母液备用。
3. 把母液用水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.1 mg/mL。

| 吸取 100uL 标准品母液至新的离心管中, 加入 900uL 水, 混匀作为标品稀释液备用。 |     |      |      |      |      |     |
|-------------------------------------------------|-----|------|------|------|------|-----|
| 标品浓度<br>mg/mL                                   | 0   | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| 标品稀释液<br>uL                                     | 0   | 40   | 80   | 120  | 160  | 200 |
| 水 uL                                            | 200 | 160  | 120  | 80   | 40   | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                       |     |      |      |      |      |     |

4. 按照测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL)                            | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|--------------------------------------|-----|------------|
| 样本                                   | 30  |            |
| 提取液                                  |     | 30         |
| 试剂一                                  | 40  | 40         |
| 试剂二                                  | 40  | 40         |
| 混匀, 于 50℃水浴 20min                    |     |            |
| 试剂三                                  | 40  | 40         |
| 混匀, 5000rpm 室温离心 5min, 取出全部上清液待下一步反应 |     |            |

显色反应:

| 试剂名称 (μL)                                                                     | 测定管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 上清液                                                                           | 90  | 90           |
| 水                                                                             | 90  | 90           |
| 试剂四                                                                           | 20  | 20           |
| 混匀, 室温反应 10min, 取出全部澄清液体至 1mL 比色皿中, 于 700nm 处读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-A0 浓度管。 |     |              |