



总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书

(货号: PB1020F48 分光法 48样)

有效期: 3个月

注意: 正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

研究意义:

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药学研究中常常检测血浆、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及各种抗氧化物(antioxidant)溶液的总抗氧化能力。

测定原理:

在酸性环境下,抗氧化物质还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ的能力反映了总抗氧化能力。

自备实验用品:

恒温水浴锅、低温离心机、分光光度计、无水乙醇、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂一: 液体 50 mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂二: 液体 5 mL×1 瓶, 4°C 避光保存。

试剂三: 液体 5 mL×1 瓶, 4°C 避光保存。

标准品: 粉末 4mg×1 支, 4°C 保存。

混合液(现配现用): 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。

样品的制备:

(1) 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

血浆(制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝,不宜使用 EDTA 抗凝)4°C, 5000rpm 离心 10min, 取上清待测。血清、唾液或尿液样品直接用于测定,也可以-80°C冻存(不宜超过 30 d)后再测定。

(2) 组织样品

按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约0.1g 组织,加入 1mL 提取液)进行冰浴匀浆,然后 10000g, 4°C离心 10min, 取上清,置冰上待测。

(3) 细菌、细胞样品

按照细菌、细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议500万细菌、细胞加入 1mL 提取液),冰浴超声波破碎(功率200W, 超声3s, 间隔 10s, 重复30次);10000g, 4°C离心 10min, 取上清,置冰上待测。

操作步骤:

1、分光光度计预热 30min, 调节波长至 593nm。

2、Trolox 标准曲线的制备: 称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管, 再加 2mL 乙醇溶解充分溶解, 即 4 μ mol/mL 标准品, 备用。取 4 μ mol/mL 的 Trolox 标准液用提取液稀释成不同浓度: 0.1 μ mol/mL、



0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.4 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.8 $\mu\text{mol/mL}$ 、1.2 $\mu\text{mol/mL}$ 、1.6 $\mu\text{mol/mL}$ 、2.0 $\mu\text{mol/mL}$ 进行标准曲线的制备。

浓度	Trolox (μl)	提取液 (μl)
0.1 $\mu\text{mol/mL}$	5	195
0.2 $\mu\text{mol/mL}$	10	190
0.4 $\mu\text{mol/mL}$	20	180
0.8 $\mu\text{mol/mL}$	40	160
1.2 $\mu\text{mol/mL}$	60	140
1.6 $\mu\text{mol/mL}$	80	120
2.0 $\mu\text{mol/mL}$	100	100

按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。

3、操作表

	空白管	测定管	标准管
混合液 (μL)	900 μL	900 μL	900 μL
标准品 (μL)			30 μL
样品 (μL)		30 μL	
双蒸水 (μL)	120 μL	90 μL	90 μL
充分混匀，反应 10min，双蒸水调零，1cm 光径，测定 OD ₅₉₃ 。（注：对照管只需测定一次）			

注意：

1、若测定吸光值超出标准线性吸光范围：高于最高值建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改

结果计算：

标准曲线的绘制 以 Trolox 质量 (0nmol、3nmol、6nmol、12nmol、24nmol、36nmol、48 nmol、60nmol) 为 x 轴，以其对应的 ΔA ($\Delta A = \text{OD 测定} - \text{OD 空白}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x (nmol)。

单位定义：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。

(1) 按血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/mL}$) = $(\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div V_{\text{样}} \times D$

(2) 按样本鲜重计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/g 鲜重}$) = $(\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times D$

(3) 按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $(\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times D$

(4) 按照细菌、细胞数量计算



总抗氧化能力 ($\mu\text{mol}/10^4\text{ cell}$) = $(\Delta A - b) \div k \times 10^{-3} \div (V_{\text{样}} \div 500 \times W) \times D$

V 样总: 加入提取液体积, 1.0 mL; W: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 500: 细菌或细胞总数, 万; V 样: 反应中样品体积, 30 μL =0.03 mL; D: 稀释倍数, 未稀释即为 1;

注意事项:

- 1.试剂二对人体有刺激性, 请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。
- 2.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。
- 3.样品中不宜添加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。