

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书

(货号: PB1020W96 微量法 96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、酶标仪、96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 120mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂一: 液体 16mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂二: 液体 1.6mL×1 瓶, 4℃避光保存。

试剂三: 液体 1.6mL×1 瓶, 4℃避光保存。

标准品: 粉末 4mg×1 支, 4℃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℃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℃, 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℃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℃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℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

操作步骤:

1、酶标仪预热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 $4\mu\text{mol/mL}$ 标准品，备用。取 $4\mu\text{mol/mL}$ 的 Trolox 标准液用提取液稀释成不同浓度： $0.1\mu\text{mol/mL}$ 、 $0.2\mu\text{mol/mL}$ 、 $0.4\mu\text{mol/mL}$ 、 $0.8\mu\text{mol/mL}$ 、 $1.2\mu\text{mol/mL}$ 、 $1.6\mu\text{mol/mL}$ 、 $2.0\mu\text{mol/mL}$ 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)	$180\mu\text{L}$	$180\mu\text{L}$	$180\mu\text{L}$
标准品 (μL)			$6\mu\text{L}$
样品 (μL)		$6\mu\text{L}$	
双蒸水 (μL)	$24\mu\text{L}$	$18\mu\text{L}$	$18\mu\text{L}$
充分混匀，反应 10min，双蒸水调零，微量石英比色皿/96 孔板，测定 593nm 吸光值。 $\Delta A_{\text{测定}} = OD_{\text{测定}} - OD_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}}$ （注：空白管只需测定一次）。			

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 、 0.6nmol 、 1.2nmol 、 2.4nmol 、 4.8nmol 、 7.2nmol 、 9.6nmol 、 12nmol) 为 x 轴，以其对应的 ΔA ($\Delta A = OD_{\text{测定}} - OD_{\text{空白}}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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

电话：400-669-2220 13437835247（微信同号）

官网：<http://www.perseebio.com.cn>

地址：北京市大兴区黄村镇观音寺南里海北路 1 号



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

(4) 按照细菌、细胞数量计算

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

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1.0 mL; W : 样品质量, g; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 500: 细菌或细胞总数, 万; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积, $6 \mu\text{L} = 0.006 \text{ mL}$; 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。