

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY005-96 微板法 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100mL×1瓶, 4℃保存。

试剂一: 液体15mL×1瓶, 4℃保存。

试剂二: 液体1.5mL×1瓶, 4℃避光保存。

试剂三: 液体1.5mL×1瓶, 4℃避光保存。

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、操作表

	对照管	测定管
混合液 (μL)	180μL	180μL
样品 (μL)		6μL
双蒸水 (μL)	24μL	18μL
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。 $\Delta A = OD_{\text{测定}} - OD_{\text{对照}}$ (注: 对照管只需测定一次)。		

注意：空白管只需测定一次，若测定管吸光值大于 1.5 则需要用提取液稀释。

总抗氧化能力计算公式：

标准曲线： $y = 0.6308x + 0.1291$ $R^2 = 0.9989$ x: Trolox 浓度($\mu\text{mol/mL}$)
y: 吸光值差值 ΔA

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 (U/mL) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.6308 = 1.585 \times (\Delta A - 0.1291)$

(2) 按样本鲜重计算

总抗氧化能力 (U/g 鲜重) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.6308 \div (W \div V_{\text{样总}})$
= $1.585 \times (\Delta A - 0.1291) \div W$

(3) 按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力 (U/mg prot) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.6308 \div C_{\text{pr}}$
= $1.585 \times (\Delta A - 0.1291) \div C_{\text{pr}}$

(4) 按照细菌、细胞数量计算

总抗氧化能力 ($\text{U}/10^4 \text{ cell}$) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.6308 \div (500 \div V_{\text{样总}})$
= $0.00317 \times (\Delta A - 0.1291) \div 500$

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.3154x + 0.1291$; $R^2 = 0.9989$

(1) 按血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

总抗氧化能力 (U/mL) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.3154 = 3.17 \times (\Delta A - 0.1291)$

(2) 按样本鲜重计算

总抗氧化能力 (U/g 鲜重) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.3154 \div (W \div V_{\text{样总}})$
= $3.17 \times (\Delta A - 0.1291) \div W$

(3) 按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力 (U/mg prot) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.3154 \div C_{\text{pr}}$
= $3.17 \times (\Delta A - 0.1291) \div C_{\text{pr}}$

(4) 按照细菌、细胞数量计算

总抗氧化能力 ($\text{U}/10^4 \text{ cell}$) = $(\Delta A - 0.1291) \div 0.3154 \div (500 \div V_{\text{样总}})$
= $0.00634 \times (\Delta A - 0.1291) \div 500$

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

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。