总还原力试剂盒说明书

（货号：ADS-W-KY026　微板法 96 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. 开盖前可甩动几下，使粉剂落入容器底部； 2. 临用前加入 5mL 水充分溶解备用； 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 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 2mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	4. 若重新做标曲，则用到该试剂； 5. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 6. 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		

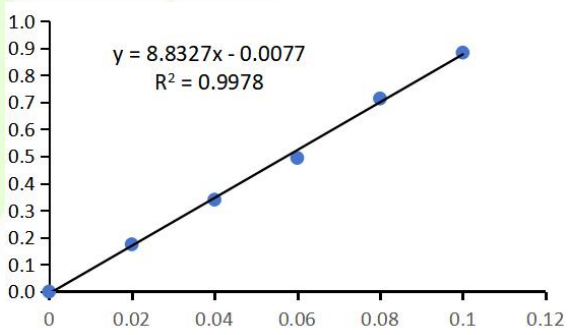
③ 显色反应：

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，△A=A 测定-A 空白。		

【注】 若△A 的值在零附近，可增加样本量 V1（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 V1 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△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：

总还原力(μg/g 鲜重)=[(△A+0.0077)÷8.8327×V1×10^3]÷(V1÷V×W)×D

=113.22×(△A+0.0077)÷W×D

4、按蛋白浓度计算：

总还原力(μg/mg prot)=[(△A+0.0077)÷8.8327×V1×10^3]÷(V1÷V×Cpr)×D

=113.22×(△A+0.0077)÷Cpr×D

5、液体样本计算：

总还原力(μg/ mL)=[(△A+0.0077)÷8.8327×V1×10^3]÷V1×D

=113.22×(△A+0.0077)×D

6、按细菌或细胞数量计算：

总还原力(μg/10^4 cell)=[(△A+0.0077)÷8.8327×V1×10^3]÷(V1÷V×500)×D

=0.2264×(△A+0.0077)×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 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 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，△A=A 测定-A0 浓度管。		