

总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒说明书

(货号: A015-3-1 FRAP法 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否

则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂盒组成与试剂配制 (试剂盒有效期 1 年)

试剂组成	试剂名称	规格	保存条件
试剂一	缓冲液	15mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	基质液	1.5mL×1 支	-20℃避光保存
试剂三	底物液	1.5mL×1 支	-20℃避光保存
FRAP 工作液配制: 按照试剂一: 试剂二: 试剂三为 10:1:1 的比例混合, 充分混匀, 避光 37℃预温, 现用现配, 2 小时内用完。			
试剂四	FeSO ₄ ·7H ₂ O 标准品	约 100mg×1 支	-20℃保存
随试剂盒附送 96 孔板一块			

二、预期用途

用于血清、血浆、组织、细胞 (或细胞上清)、唾液、尿液等样本中总抗氧化能力测定。

三、测定原理

在酸性条件下抗氧化物质可以还原 Fe³⁺-TPTZ 产生蓝紫色的 Fe²⁺-TPTZ, 在 593nm 处读取吸光度, 再根据标准品定标, 可以计算出样品中的总抗氧化能力。

四、测定意义

机体中存在多种抗氧化的大分子、小分子及酶类等, 这些均可以清除体内产生的各种活性氧, 从而阻止活性氧诱导的氧化应激的产生。一个体系内的各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总体水平即体现了该体系内的总抗氧化能力。因此测定血清浆等体液鸡组织、细胞裂解液中的总抗氧化能力具有非常重要的意义。

五、所需仪器及试剂

酶标仪(585-605nm)及 96 孔板 (附送一块), 各种规格移液器, 离心机, 蒸馏水 (或去离子水), 生理盐水或 PBS (0.01mol/L, pH7.0-7.4), 蛋白测定试剂 (动物组织或细胞样本用, 本公司有售)。

六、样本前处理

1、血清(浆)、唾液、尿液、细胞上清等液体样本:

血液样本采集后需及时分离血清或血浆, 避免溶血。唾液、尿液、细胞上清等直接取样进行测定。血浆建议肝素或柠檬酸钠抗凝, 不宜采用 EDTA。文献报道, 人血清总抗氧化能力为 0.5-2mmol/L, 人唾液总抗氧化能力为 0.3-1mmol/L。

2、动(植)物组织样本:

准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:4 的比例, 加入 4 倍体积的生理盐水或者 PBS, 冰水浴条件下机械匀浆, 以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物, 4℃, 12000 转/分, 离心 5 分钟, 取上清测定。

3、细胞样本

收集不少于 100 万细胞(建议细胞刮处理, 不宜使用胰酶和 EDTA 消化), 加入 200μL 冰冷的 PBS (0.01mol/L, pH7.0-7.4), 匀浆或超声以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物, 4℃, 12000 转/分, 离心 5 分钟, 取上清测定。

七、测定步骤

1、标准品配制: 称取 27.8mg 本试剂盒提供的 FeSO₄·7H₂O 标准品, 加入 1mL 蒸馏水涡旋混匀充分溶解 (此时浓度即为 100mmol/L (即 100mmol/L))。取 100mmol/L FeSO₄·7H₂O 标准液 15μL 加蒸馏水 985μL 混合配成 1.5mmol/L 浓度, 再用 1.5mmol/L 浓度标准液用蒸馏水依次配成 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 各个浓度, 稀释方法如下:

1.5mmol/L 标准液 (μL)	0	12	24	48	72	96	120
蒸馏水 (μL)	60	108	96	72	48	24	0
对应标准浓度 (mmol/L)	0	0.15	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5

2、然后按操作表标准孔操作, 得到 OD 值计算 ΔA 值后, 对

应标准品浓度制作标准曲线得到线性方程 (x 为 ΔA 值, y 为浓度)。

3、操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水 (μL)	5		
不同浓度的标准液 (μL)		5	
样本 (μL)			5
FRAP 工作液 (μL)	180	180	180
37℃ 孵育 3-5min, 波长 593nm (或在 585-605nm 内选), 酶标仪读取各孔 OD 值, ΔA=A _{测定} -A _{空白} (或是 A _{标准} -A _{空白})			

注: FeSO₄ 溶液宜新鲜配制使用。100mmol/L FeSO₄ 溶液容易氧化产生三价铁盐, 使颜色变为浅黄色。如果发现溶液的颜色已经呈现明显的黄色, 应该弃用, 并重新配制新鲜的标准液。

八、计算

本试剂盒总抗氧化能力用对应 FeSO₄ 标准溶液的浓度来表示, 不同样本计算方法如下:

1、血清(浆)等液体样本计算:

$$\text{样本 T - AOC 能力 (mmol/L)} = \frac{\text{样本 } \Delta A \text{ 代入标曲}}{\text{计算得到的值 (mmol/L)}} \times N$$

2、组织或细胞样本按蛋白计算:

$$\text{样本 T - AOC 能力 (mmol/g 蛋白)} = \frac{\text{样本 } \Delta A \text{ 代入标曲}}{\text{计算得到的值 (mmol/L)}} \div \text{Cpr}$$

3、组织样本按质量计算 (常用于植物样本):

$$\text{样本 T - AOC 能力 (mmol/g 组织)} = \frac{\text{样本 } \Delta A \text{ 代入标曲}}{\text{计算得到的值 (mmol/L)}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

4、细胞样本按细胞密度计算:

$$\text{样本 T - AOC 能力 (mmol/10}^4 \text{ 个细胞)} = \frac{\text{样本 } \Delta A \text{ 代入标曲}}{\text{计算得到的值 (mmol/L)}} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中,

N: 样本测试前稀释倍数;

Cpr: 组织或细胞匀浆液蛋白浓度, g/L;

W: 组织样本质量, g;

V_{样总}: 组织匀浆 (或细胞破碎) 时加入的匀浆介质的总体积, L;

细胞总数: 细胞破碎时的总数量, 10⁴ 个。

九、注意事项

- 在酸性条件下呈蓝色或近蓝色的试剂对测定结果会产生干扰, 需要尽量避免。
- 如样本中含有高浓度的铁盐或亚铁盐, 都会干扰测定, 由于在酸性条件可以抑制样品中内源性物质的干扰。血清(浆)中铁离子或者亚铁离子的总浓度总是低于 10μmol/L, 所以不会干扰到 FRAP 法测定。样本中含有少量的金属离子螯合剂也不会影响到测定。
- 样本中不能添加 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的物质, 也不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂。
- 样本测定 OD 值如比较接近标曲的 0 孔, 为样本总抗氧化能力偏低, 可考虑增加样本浓度测定或用本公司另一款 A015-2-1 (ABTS 法) 试剂盒测定;
- 样本如不能及时检测, 建议 -80℃ 冻存, 在一个月所测数据没有显著变化。
- 本试剂盒仅用于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品及药品。
- 试剂二对人体有刺激性, 请穿实验服并带手套操作。