

总抗氧化能力(T-AOC)测试盒说明书

(货号: A015-2-1 微板法 ABTS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、试剂组成与配制 (试剂盒有效期 6 个月)

试剂组成	试剂名称	规格	保存条件
试剂一	缓冲液	20mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	ABTS 溶液	1mL×1 支	-20℃,避光保存
试剂三	浓缩底物溶液	0.5mL×1 支	-20℃保存
	试剂三应用液配制: 临用前按照 1:39 的比例 (即 40 倍稀释) 用蒸馏水稀释成应用液, 现用现配		
ABTS 工作液配制: 按照试剂一:试剂二:试剂三应用液=76:5:4 的比例配制成 ABTS 工作液, 用多少配多少, 室温避光保存, 30 分钟内使用完。			
试剂四	酶溶液	0.2mL×1 支	-20℃保存
	试剂四应用液配制: 临用前按酶溶液: 试剂一 = 1:9 的比例 (即 10 倍稀释) 配成试剂四应用液, 现用现配。		
试剂五	10mM Trolox 标准液	0.1mL×1 支	-20℃,避光保存
附送一次性 96 孔板一块			

二、预期用途

用于血清、血浆、组织匀浆、细胞 (或细胞上清) 等样本中总抗氧化能力测定。

三、测定原理

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 ABTS⁺, 在抗氧化物存在时, ABTS⁺ 的产生会被抑制, 在 405nm 或 734nm 测定 ABTS⁺ 的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种 VE 的类似物, 具有和 VE 相近的抗氧化能力, 用作其它抗氧化物总抗氧化能力的参考。例如, Trolox 的总抗氧化能力为 1, 相同浓度情况下, 其它物质的抗氧化能力用其抗氧化能力和 Trolox 相比的倍数来表示。ABTS⁺ $\xrightarrow{\text{Antioxidant}}$ ABTS

四、所需仪器及试剂:

各种类型的酶标仪 (405-425nm) 或者可以测定微量体系的分光光度计, 涡旋混匀器, 蒸馏水, 蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售)。

五、样本前处理

1、血清(浆)、唾液、尿液、细胞上清等液体样本的制备:

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。

2、组织样本:

准确称取组织按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 充分破碎细胞释放其中的抗氧化物, 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 (0.01M, 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。

注: 组织或细胞样本制成匀浆后需要测定其蛋白浓度, 可以用本公司 A045-2 考马斯亮蓝法蛋白定量测试盒或者 A045-3/-4 的 BCA 法蛋白定量试剂盒测定。

六、操作表

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水 (μL)	10		
不同浓度的标准液 (μL)		10	
待测样本 (μL)			10
试剂四应用液 (μL)	20	20	20
ABTS 工作液 (μL)	170	170	170
室温避光静置 6min, 波长 405nm (或在 405-425nm 内选), 酶标仪读取各孔 OD 值。			

注: 反应完后尽快读数, 标准品 10mM (10mmol/L) Trolox 溶液用蒸馏水稀释成 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0mM 浓度按标准孔操作后制作标准曲线。(标准曲线只需做一次) (见附录 I)

七、计算:

1、标曲拟合: 以标准品 OD 值为横坐标, 各 OD 值对应的标准品浓度为纵坐标制成标准曲线, 用作图软件 (或 EXCEL 表) 制得曲线公式, 把样本测定管测得的 OD 代入计算公式, 即可求得样本溶液中 T-AOC 的结果 (在本方法中, 采用 Trolox 作为标准品进行总抗氧化能力检测时, 样品的抗氧化能力可以用相应浓度的 Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) 来表示)。

2、对于液体样本 (如血清浆、唾液、尿液等), 可以直接用代入标曲计算得到的 Trolox 的摩尔浓度来表示, 而对于有些需要稀释的样本 (总抗氧化能力大于 1mM), 稀释以后测得结果需要乘以其稀释倍数, 最后以 mmol (Trolox) /L 来表示。

3、对于细胞或动物组织样本, 计算时将代入标曲计算得到的相对应的 Trolox 的摩尔浓度, 再除以匀浆液的蛋白浓度, 最后以 mmol (Trolox) /g 蛋白来表示。

4、对于一些提取物 (可溶性) 样本, 计算时将代入标曲计算得到的相对应的 Trolox 的摩尔浓度, 再除以提取物的质量浓度 (g 鲜重/L), 最后以 mmol (Trolox) /g 鲜重来表示。

八、参考值范围:

人血清(浆)中的总抗氧化能力为 0.5~2mM; 人尿液总抗氧化能力为 0.2-3mM (本参考值仅供参考, 建议各实验室建立自己的参考值范围)。

十、注意事项:

- 待测样本如有高脂(或有浊度)、溶血 (或有特殊颜色) 等干扰情况, 需为每个样本做一个自身对照孔 (即 10μL 样本+190μL PBS (0.01M, pH7.0-7.4) 或生理盐水混合后, 静置 6min, 405nm 处读吸光值), 计算时每个样本测定孔的吸光值需减去每个样本对应的自身对照孔的吸光值 (再加上空板吸光值) 后, 作为样本测定吸光值代入标曲计算;
- 试剂三底物液见光或长时间存放时浓度会有所下降, 导致标准曲线线性下降, 测试前可以通过空白孔来判断: 空白孔 OD 值低于 1.0 时可适当加大试剂三应用液浓度 (如将试剂三应用液的配制调整到 30 倍或 25 倍稀释); 相反如果空白 OD 值较高时, 有可能是试剂三应用液配制浓度偏高了, 可适当降低其浓度;

- 3、空白孔 OD 值一般在 1.0~1.5 间，此 OD 值偏低时可调高试剂三应用液的浓度，反之则可降低其浓度；
- 4、做预试时，可挑选 2 例样本分别稀释一定倍数（如 2 倍、5 倍、10 倍）加上标曲中空白管（0mM）和 1mM 两个浓度同时测定，选取样本 OD 值接近空白孔和 1.0mM 标准孔的 OD 值的中间值对应的稀释倍数稀释样本进行正式实验；
- 5、孔板操作时注意不要加进去气泡，以免对读数造成影响；

附录 I：标准曲线的制作

1、前处理：

取 10mM Trolox 标准液 20 μ L 加蒸馏水 180 μ L 稀释成 1 mM 浓度，再将 1 mM 标准液用蒸馏水稀释成 0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.8mM 制作标准曲线。稀释方法如下(仅供参考，也可按需配制)：

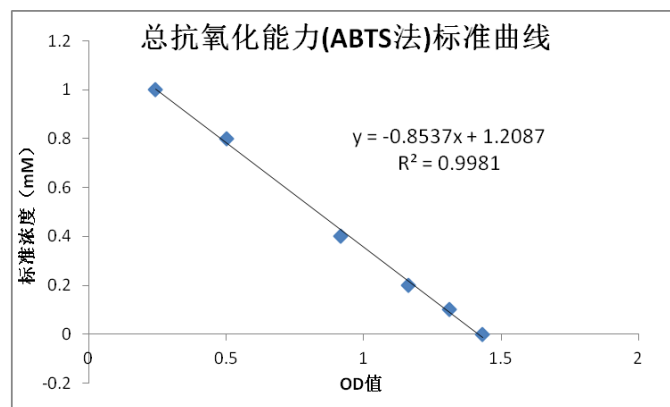
1 mM 标准液用量	10 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L	10 μ L
蒸馏水用量	90 μ L	40 μ L	30 μ L	10 μ L	0
稀释比例	1:9	1:4	2:3	4:1	0
终浓度	0.1 mM	0.2 mM	0.4 mM	0.8mM	1 mM

2、操作表：

	空白孔	标准孔
蒸馏水 (μ L)	10	
不同浓度标准应用液 (μ L)		10
试剂四应用液 (μ L))	20	20
ABTS 工作液 (μ L)	170	170
室温避光静置 6min，波长 405nm，酶标仪读取各孔 OD 值		

3、结果：

标准品浓度(mM)	OD 值
0	1.4324
0.1	1.3098
0.2	1.1632
0.4	0.9172
0.8	0.5011
1.0	0.2431



标准曲线需要用户自己制作，用 EXCEL 表软件拟合的公式就可以用来计算。标准曲线各个浓度对应的 OD 值会因试剂的不同批次或是操作的不同时间、不同人员等出现差异，属正常现象，只需其线性 (R^2) 大于 0.99 即可计算。