

总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒说明书

(货号: A015-1 分光光度法 比色法)

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、测定原理:

机体中有许多抗氧化物质,能使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物,通过比色可测出其抗氧化能力的高低。

二、测定意义:

机体防御体系的抗氧化能力的强弱与健康程度存在着密切联系,该防御体系有酶促与非酶促两个体系,许多酶是以微量元素为活性中心,例如:超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)等,非酶促反应体系中主要为维生素、氨基酸和金属蛋白质。例如:VE、胡萝卜素、VC、半胱氨酸、蛋氨酸、色氨酸、组氨酸、葡萄糖、铜兰蛋白、转铁蛋白、乳铁蛋白等。这个体系的防护氧化作用主要通过三条途径:(1)消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化;(2)分解过氧化物,阻断过氧化链;(3)除去起催化作用的金属离子。防御体系各成分之间相互起到了协同作用,以及代偿作用与依赖作用。

三、试剂组成与配制:(试剂盒有效期6个月)

	试剂组成	A015-1-1 50管/25样	A015-1-2 100管/50样	保存条件
试剂一	无色液体	60mL×1瓶	60mL×2瓶	4℃
试剂二	白色晶体	粉剂×1支	粉剂×2支	4℃
	试剂二应用液配制:每支粉剂加蒸馏水120mL充分溶解(粉剂较难溶解,如需加快溶解,可以在37℃水浴溶解),配好后可4℃保存至少1个月。			
试剂三	黄色贮备液	3mL×1瓶	5mL×1瓶	4℃避光
	稀释液	30mL×1瓶	60mL×1瓶	4℃
	试剂三应用液配制:取贮备液用稀释液以1:19的体积比稀释,现用现配。			
试剂四	无色粘稠液体	12mL×1瓶	24mL×1瓶	室温
试剂五	无色透明液体	12mL×1瓶	24mL×1瓶	室温
	注意:试剂五天冷或从冰箱取出时可能会凝固,测试前37℃加热溶解直至澄清透亮方可使用。			

四、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及1cm光径比色皿,涡旋混匀器,烧杯,37℃水浴锅或恒温箱,蒸馏水(或去离子水),生理盐水,蛋白测定试剂(组织或细胞样本用,本公司有售)。

注: 本试剂盒不建议使用酶标仪读数(否则偏差较大),如只有酶标仪,可选购本公司其他货号本指标产品(如A015-2-1(ABTS法)或A015-3-1(FRAP法))。

五、样本前处理:

- 血清(浆)样本前处理:** 血浆在测试前4000转/分,离心10分钟,取上清待测,否则有些抗凝剂会引起沉淀及混浊,肝素抗凝的血浆不要离心(血浆建议肝素或柠檬酸钠抗凝,不宜采用EDTA),血清不需要离心。
- 组织样本的前处理:** 准确称取组织重量,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,制备成10%的匀浆液,4000转/分,离心10分钟,取上清液待测。同时用考马斯亮蓝法测定匀浆蛋白浓度。
- 培养细胞的前处理:** 将培养细胞用胰酶消化,再用PBS(与细胞等渗)冲洗,1000转/分,离心10分钟,弃上清,留下层细胞,用生理盐水或PBS重悬,制备成 10^7 /mL的悬液,再进行破碎。破碎细胞的方法有三种:
①、用匀浆器匀浆。(可以用匀浆机,也可以用玻璃匀浆器手工匀浆。)
②、用超声粉碎器粉碎(功率200-300W,低温下运行5-10秒,间隔15秒,反复3-5分钟)。
③、反复冻溶3次(-80度至常温或25-37℃循环)。(第③种

方法有时会影响样本总体活力,一般不建议使用)制备好的细胞匀浆4000转/分,离心10分钟,取上清液待测。同时用考马斯亮蓝试剂测定匀浆上清液的蛋白浓度。

4、细胞培养上清及部分体液均可以按照血清样本处理,一般直接加样测定。

5、全血样本前处理: 一般用蒸馏水10倍稀释,具体稀释倍数及取样量要做预试。

六、操作步骤:

(一)、血清(浆)中T-AOC的测定:

- 操作表:** (试剂一、试剂二应用液、试剂三应用液可按操作表比例及需要量提前配制成混合液,一次性加入反应,但配好的混合液需尽快使用)

	测定管	对照管
血清(浆)(mL)	0.1	
试剂一(mL)	1	1
试剂二应用液(mL)	2	2
试剂三应用液(mL)	0.5	0.5
旋涡混匀器充分混匀,37℃水浴30分钟		
试剂四(mL)	0.1	0.1
血清(浆)(mL)		0.1
混匀,25~37℃放置10分钟,波长520nm,1cm光径,蒸馏水调零,分光光度计测定各管吸光度值A		

2、单位定义及计算公式:

- 定义:** 在37℃时,每毫升血清(浆)每分钟使反应体系的吸光度(OD)值每增加0.01时,为一个总抗氧化能力单位(U)。

②、计算公式:

$$\text{总抗氧化能力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

T:反应时间,30min;
V_{反应}:反应体系总体积,3.7mL;
V_样:取样量,0.1mL;
N:样本测试前稀释倍数。

(二)、组织或细胞中T-AOC的测定:

- 操作表:** (试剂一、试剂二应用液、试剂三应用液可按操作表比例及需要量提前配制成混合液,一次性加入反应,但配好的混合液需尽快使用)

	测定管	对照管
待测匀浆(mL)	a*	
试剂一(mL)	1	1
试剂二应用液(mL)	2	2
试剂三应用液(mL)	0.5	0.5
旋涡混匀器充分混匀,37℃水浴30分钟		
试剂四(mL)	0.2	0.2
待测匀浆(mL)		a*
试剂五(mL)	0.2	0.2
混匀,25~37℃放置10分钟,波长520nm,1cm光径,蒸馏水调零,分光光度计测定各管吸光度值A		

a*为参考取样量(10%组织匀浆取样0.1~0.2mL,细胞匀浆可取样0.2~0.3mL)

2、单位定义及计算公式:

①、组织或细胞按蛋白计算方法:

定义: 在37℃时,样本中每毫克组织蛋白对应的抗氧化物质,每分钟使反应体系的吸光度(OD)值,每增加0.01时,为一个总抗氧化能力单位(U)。

计算公式:

总抗氧化能力
(U / mg 蛋白) = $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N \div C_{\text{pr}}$

②、组织样本按样本鲜重计算方法:

定义: 在 37℃时, 每克组织含有的抗氧化物质, 每分钟使反应体系的吸光度 (OD) 值, 每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位 (U)。

计算公式:

总抗氧化能力
(U / g 组织) = $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$

以上公式中,
T:反应时间, 30min;
V_{反应}:反应体系总体积, mL;
V_样:取样量, mL;
N:样本测试前稀释倍数;
C_{pr}:组织匀浆蛋白浓度, mg/mL;
W: 组织样本重量, g;
V_{样总}: 组织样本匀浆时的总体积 (约等于匀浆时加入的匀浆介质总体积), mL。

(三)、全血中 T-AOC 的测定:

1、操作步骤: (试剂一、试剂二应用液、试剂三应用液可按操作表比例及需要量提前配制成混合液, 一次性加入反应, 但配好的混合液需尽快使用)

	测定管	对照管
稀释后的全血 (mL)	0.05	
试剂一 (mL)	1	1
试剂二应用液 (mL)	2	2
试剂三应用液 (mL)	0.5	0.5
旋涡混匀器充分混匀, 37℃水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
稀释后的全血 (mL)		0.05
混匀, 25~37℃放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 A		

2、单位定义及计算公式:

①、定义: 在 37℃时, 每毫升全血, 每分钟使反应体系的吸光度 (OD) 值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位 (U)。

②、计算公式:

总抗氧化能力
(U / mL) = $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N$

T:反应时间, 30min;
V_{反应}:反应体系总体积, 3.65mL;
V_样:取样量, 0.05mL;
N:样本测试前稀释倍数, 10。