

总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒说明书 (ABTS 法)

(货号: BN73048 分光法 48 样)

一、产品简介:

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 734nm 或 414nm 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 是一种维生素 E 的类似物, 具有和维生素 E 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。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.47mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 2.86mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

工作液配置: 临用前将加水溶解后的试剂一和试剂二按照 1:1 比例混合, 避光反应 12h 后 (二天内用完), 再稀释 40 倍备用, 当待检测样品为水溶性样品时, 用 PBS 或蒸馏水稀释; 当待检测样品为非水溶性样品时, 用 80%乙醇或无水乙醇稀释 (最好现配现用)。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、无水乙醇和蒸馏水。

四、总抗氧化能力测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

注: 样品中不能添加 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。

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 的冷 PBS (水溶性样本) 或 80%乙醇 (非水溶性样本), 进行冰浴匀浆, 匀浆后转入离心管中。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

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 80%乙醇 (自备) 进行匀浆; 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 60℃, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次); 12000rpm, 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: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 414nm, 蒸馏水调零。

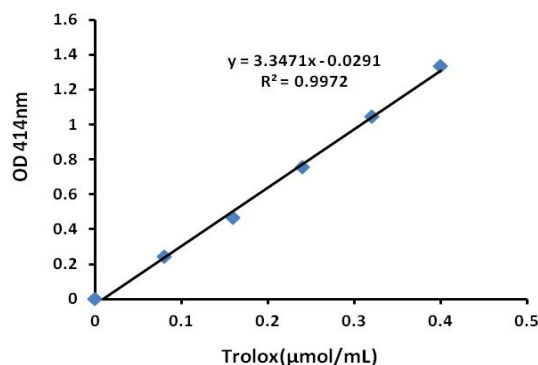
② 不同样本清除能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 若 A 测定-A 对照接近零, 需对样本进行稀释 (稀释液与组织提取液一致, 即水溶性样本用 PBS 或蒸馏水稀释, 非水溶性样本用 80%乙醇稀释) 后再检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。

③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (做一次)
样本	40	40	
PBS 或 80%乙醇		760	40
工作液	760		760
混匀, 室温 (25℃) 避光静置 6min, 所有液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 414nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ 。			

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 3.3471x - 0.0291$, x 是标准品 Trolox 摩尔浓度 (μmol/mL), y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0291) \div 3.3471 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.3 \times (\Delta A + 0.0291) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0291) \div 3.3471 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 298.8 \times (\Delta A + 0.0291) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、液体样本:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.0291) \div 3.3471 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.3 \times (\Delta A + 0.0291) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, 40μL=0.04 mL;

W---样品质量, g;

Trolox 分子量---250.29。

500---细菌或细胞总数, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (4μmol/mL): 称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管, 再加 2mL 乙醇溶解充分溶解, 即 4μmol/mL 标准品, 备用。
- 2 把母液用相应的提取液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.4μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 以上面不同浓度点为横坐标 (x), 对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y) 绘制标准曲线, 得到线性回归方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 测定带入公式中计算 x (μmol/mL)。