

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书

Total Antioxidant Capacity Assay Kit

微量法

货号: AK351

规格: 100T/96S、200T/192S

产品组成及保存条件:

编号	100T/96S	200T/192S	储存条件
提取液 ES48	100mL×1 瓶	100mL×2 瓶	4℃保存, 使用前预冷;
AK351-A	15ml ×1 瓶	30ml ×1 瓶	4℃避光保存 (有刺激味);
AK351-B	6ml ×1 瓶	12ml ×1 瓶	4℃避光保存;
AK351-C	1.5ml ×1 瓶	3ml ×1 瓶	4℃避光保存;
混合液(现配现用): AK351-A: AK351-B: AK351-C 按 10:1:1 的比例混合, 使用前 37℃预温。			
AK351-标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 抗氧化是指抗氧化自由基的简称, 英文 Anti-Oxidant。总抗氧化能力 (T-AOC) 有酶促与非酶促两个体系, 人体的抗氧化系统是一个可与免疫系统相比拟的、具有完善和复杂功能的系统, 机体抗氧化的能力越强, 就越健康, 生命也越长。越来越多的研究显示抗氧化是预防衰老的重要步骤。此检测方法适合检测血浆、血清、唾液、尿液等各种体液, 细胞或组织等裂解液、植物或中草药抽提液及各种抗氧化物 (antioxidant) 溶液的总抗氧化能力。

原理: 在酸性环境下, 还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 的能力反映了总抗氧化能力。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰、浓硫酸和双蒸水。

样品的制备:

- 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品
血浆 (制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝, 不宜使用 EDTA 抗凝) 4℃, 5000rpm 离心 10min, 取上清待测。血清、唾液或尿液样品直接用于测定, 也可以-80℃冻存 (不宜超过 30 d) 后再测定。
- 组织样品
按照组织质量 (g): 提取液 ES48 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES48) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 细胞样品
按照细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES48 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液 ES48), 冰浴超声波破碎 (功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 593nm, 蒸馏水调零。
- 标准曲线制作:
临用前在 AK351-标准品中加入 900μL 蒸馏水, 再滴加 20μL 浓硫酸, 制备 40 μmol/mL $FeSO_4$ 标准溶液; 将 40μmol/mL $FeSO_4$ 标准溶液用蒸馏水稀释至 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156μmol/mL, 吸取 100μL 标准溶液 (蒸馏水作空白) 加入 100μL 试

AK351-B, 充分混匀, 反应 10min, 测定 593nm 下的吸光度, 计算 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$, 此时 Fe^{2+} 终浓度为 0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156、0.00078 $\mu\text{mol/mL}$ 。

3. 在微量石英比色皿/96 孔板中按列表中顺序加入上述试剂,

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
混合液	180	180
样品		6
蒸馏水	24	18
充分混匀, 反应 10min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 测定 593nm 吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ (空白管只需测定 1-2 次)		

注意: 空白管只需测定一次。

总抗氧化能力计算公式:

1. 标准曲线绘制

以 Fe^{2+} 终浓度为横坐标 (x), 以 ΔA 为纵坐标 (y) 绘制标准曲线, 得到线性回归方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 带入方程求得 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. 计算公式:

单位定义: 样本的抗氧化能力以达到同样吸光度变化值 (ΔA) 所需的标准液离子浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 表示。

(1) 按蛋白浓度计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 34 \times x \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 34 \times x \div W$

(3) 按细胞数量计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量} = 34 \times x \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/mL}$) = $x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 34 \times x$

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.204mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.006mL; W : 样本质量, g; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10^4 为单位, 以万计。

注意事项:

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 尽量避免使用在酸性条件下呈蓝色或接近蓝色的试剂, 否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
3. 样品中不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂和 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的还原剂。
4. 如果样品测定出来的吸光值在标准曲线范围以外, 需把样品适当稀释或浓缩后再进行测定。