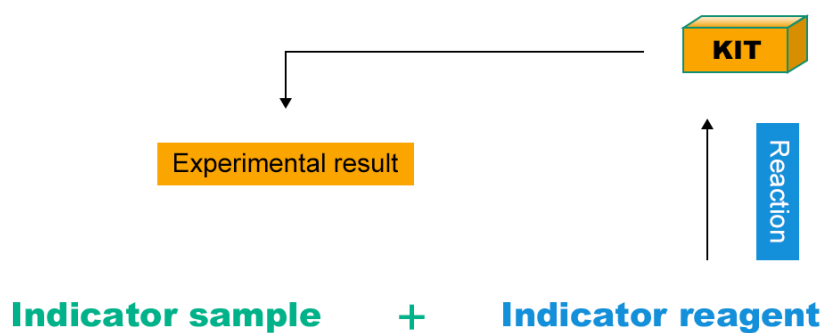


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0627

Size: 50T/48S

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药学研究中常常检测血浆、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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、恒温水浴锅、低温离心机、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL × 1 瓶	4°C 保存	使用前预冷
试剂一	液体 35mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 20mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂三	液体 5mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4°C 保存	10mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 临用前加入 1.75ml 蒸馏水, 滴加 1 滴浓硫酸, 制备 20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ FeSO_4 标准溶液。
混合液(现配现用):将试剂一、试剂二、试剂三按 7:1:1 的比例混合, 使用前预温至 37°C。			

五、操作步骤：

● 样品的制备：

1. 血清、血浆、唾液或尿液样品

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）5000r/min 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。

2. 细胞或组织样品

收集约 100-200 万个细胞或者约 0.1g 组织，加入 1.0mL 预冷的提取液，匀浆或超声以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物，4℃、10000r/min 离心 5 分钟，取上清待测。需测定蛋白浓度。

● 测定步骤

1、标准曲线绘制：

将 20 $\mu\text{mol/mL}$ FeSO_4 标准溶液稀释至 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156 $\mu\text{mol/mL}$ ，分别取 500 μL 标准溶液（蒸馏水作空白）加入 500 μL 试剂二，充分混匀，反 10min，双蒸水调零，1cm 光径，测定 A_{593} ，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 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 593nm，蒸馏水调零。

3、操作表

	空白管	测定管
混合液（ μL ）	900 μL	900 μL
样品（ μL ）		30 μL
双蒸水（ μL ）	120 μL	90 μL
充分混匀，反应 10min，双蒸水调零，1cm 光径，测定 A_{593} ，计算 $\Delta A' = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白管}}$ 。 （注：空白管只需测定一次）		

六、总抗氧化能力计算

1、标准曲线绘制

以 Fe^{2+} 终浓度为横坐标，以 ΔA 为纵坐标绘制标准曲线，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：样品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表示。

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样品质量计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

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

$V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，1.02mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样品体积，0.03mL； W ：样品质量，g； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； 细胞数量：以 10^4 为单位，万个。

七、注意事项：

1. 试剂二对人体有刺激性，请采取适当的防护措施。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样本，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。
5. 试剂盒 2-8℃ 保存。