

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-S0893

Size: 50T/24S

ABTS 自由基清除能力检测试剂盒说明书

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：

ABTS 法可用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定， 是使用最广泛的间接检测方法。

二、测定原理：

ABTS 经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子 ABTS 自由基，在 405nm 或 734nm 处有最大吸收峰。被测物质加入 ABTS 自由基溶液后，所含抗氧化成分能与 ABTS 自由基发生反应而使反应体系褪色，405nm 的吸光度下降，在一定范围内其吸光度的变化与自由基被清除的程度成正比。本试剂盒中，通过测定吸光度下降的程度来反映样本清除 ABTS 自由基的能力。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者 增加样本量进行检测。

三、需自备的仪器和用品：

恒温水浴锅、可见分光光度计、 1 mL 玻璃比色皿、台式离心机、研钵/粉碎机、烘干箱、30~50 目筛和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致， 有疑问请及时联系工作人员。

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20 μL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 1.5mL×1 支	-20℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	

五、溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 3mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂可分装-20℃保存，-20℃可保存两周；
2. 试剂三工作液的配制： 液体置于棕色试剂瓶中 EP 管内，临用前根据样本量按试剂三（μL）：蒸馏水（mL）=1 μL:12mL 的比例配成试剂三工作液，现用现配，用不完的试剂放于4℃保存；
3. 试剂四工作液的配制：可先将试剂四-20℃分装保存。临用前根据样本量按试剂四：试剂一（V:V）=1:9 的比例配成试剂四工作液，现配现用。
4. 试剂五：粉剂置于试剂瓶内 EP 管中，含有 5mg 维生素 C。临用前加入 2.8 mL 提取液，充分振荡溶解；配成 10mmol/L 维生素C 溶液，用于阳性对照。 4℃可保存一周。
5. ABTS 工作液的配制：临用前根据样本量按试剂一：试剂二：试剂三工作液（V:V:V）=76:5:4 的比例配成 ABTS 工作液，现用现配，室温避光保存，务必在 30 分钟内使用

六、操作步骤:

1. 样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1) 植物组织样本的制备: 将新鲜样品置于 60°C 烘箱烘干至恒重, 研钵研碎 (或粉碎机粉碎), 过 30~50 目筛; 称取约 0.05g 样本, 加入 1mL 提取液后置于 40°C 水浴锅中浸提 30 min; 10000 rpm 室温离心 10min, 取上清, 置于冰上待测。

2) 红酒、果汁等液体样本: 吸取 100 μ L 样本溶液加入 900 μ L 提取液, 旋涡振荡混匀, 室温 10000 rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3) 提取物或者药物: 可用提取液配制成一定浓度, 如 5mg/mL。

注意: 不同样本清除 ABTS 自由基的能力可能相差很大, 为保证实验结果的准确性, 样本要根据预实验结果 进行适当调整 (如清除率大于 90%, 建议将提取的样本用提取液进行稀释; 清除率小于 5%, 建议加大烘干样本质量或液体样本体积进行提取)。

2. 测定步骤

1) 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

2) 阳性对照的准备: 若需要线性关系, 建议将 10 mmol/L 的维生素 C 溶液用提取液配制成 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mg/mL 的维生素 C 溶液待用; 若需要清除率约为 90% 的阳性对照, 则建议将 10 mmol/L 维生素 C 溶液用提取液配制成大于 1.5 mmol/L 的维生素 C 溶液待用。

3) 操作表：在EP 管中分别加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	对照管	阳性对照管
上清液		50	50	
不同浓度的 VC 溶液				50
水	50			
试剂四工作液	100	100		100
ABTS 工作液	850	850		850
试剂一			950	
充分混匀后室温避光静置 6 min。测定 405 nm 处的吸光度。空白管、对照管、标准管和测定管的 吸光值分别记为 A 空白、A 对照、A 阳性对照和A 测定。空白管只需测 1-2 次。				

七、ABTS 自由基清除率的计算

1. 标准曲线的建立：

阳性对照的自由基清除率计算公式：

$$\text{ABTS 自由基清除率 } D_{VC}\% = [(A \text{ 空白} - A \text{ 阳性对照}) \div A \text{ 空白}] \times 100\%$$

2. 样本的自由基清除率计算公式：

$$\text{ABTS 自由基清除率 } D\% = [A \text{ 空白} - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})] \div A \text{ 空白} \times 100\%。$$

八、注意事项：

1. 不同样本清除 ABTS 自由基的能力可能相差很大， 如果要比较不同样品的 ABTS 自由基清除能力， 建议对于同 一批样品加入等量的样品， 红酒、组织匀浆、果汁等液体样品加入同样体积， 提取物（或者药物） 配制成同样浓度。 在比较时， 将样本根据预实验结果进行适当调整， 比较同样浓度（相同稀释倍数）的清除率大小。

2. 样品建议当天提取当天检测。