

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-S0934

Size: 50T/48S

总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法) 说明书

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:

ABTS 法是使用最广泛的间接检测方法, 可用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定。ABTS 经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 $ABTS^+$, 能溶于水相或酸性乙醇介质中, 在 734nm 处有最大吸收。被测物质加入 $ABTS^+$ 溶液后, 所含抗氧化成分能与 $ABTS^+$ 发生反应而使反应体系褪色。在 734nm 检测吸光度的变化, 并以 Trolox 作为对照体系量化抗氧化物质的抗氧化能力。

三、需自备的仪器和用品:

恒温水浴锅、低温离心机、分光光度计、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 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 60mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	粉剂 × 2 瓶	4°C 避光保存	

五、样品的制备:

(1) 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。

(2) 组织样品

按照组织质量(g): 提取液体积(mL) 为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液)进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

(3) 细胞样品

按照细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL) 为 500~1000 : 1 的比例(建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 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。

六、操作步骤:

1、分光光度计预热 30min, 调节波长至 734nm。

2、工作液的配置: 临用前取试剂二一瓶, 加入 25mL 试剂一, 震荡混匀 20min 后, 静置, 取上清使用。(注意, 现配现用)

3、操作表(在 EP 管中反应)

	空白管	测定管
提取液 (μL)	50	
样品 (μL)		50
工作液 (μL)	950	950
充分混匀, 10min 内测定 734nm 吸光值, $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$		

注意: 空白管只需测定一次, 吸取工作液时不要吸到底部沉淀, 若 $A_{\text{测定}}$ 小于 0.4, 需用提

取液稀释后检测。

七、总抗氧化能力计算公式：

1、以自由基清除率表示：

$$\text{ABTS 自由基清除率 (\%)} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}} \times 100\%$$

2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：

$$\text{标准曲线: } y = 1.4042x - 0.0012 \quad R^2 = 0.9985 \quad x: \text{Trolox 浓度} (\mu\text{mol/mL})$$

y: 吸光值差值 ΔA

单位定义: 用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的 ABTS 自由基清除能力。

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 0.712 \times (\Delta A + 0.0012) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \\ &\times C_{\text{pr}}) = 0.712 \times (\Delta A + 0.0012) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(3) 按细胞计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{cell}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \\ &\times \text{细胞数量 (万个)}) = 0.712 \times (\Delta A + 0.0012) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/mL}) = (\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 = 0.712 \times (\Delta A + 0.0012)$$

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积, 50 μL ; W : 样品质量, g; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL

八、注意事项：

1. 尽量避免使用在中碱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。
2. 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。