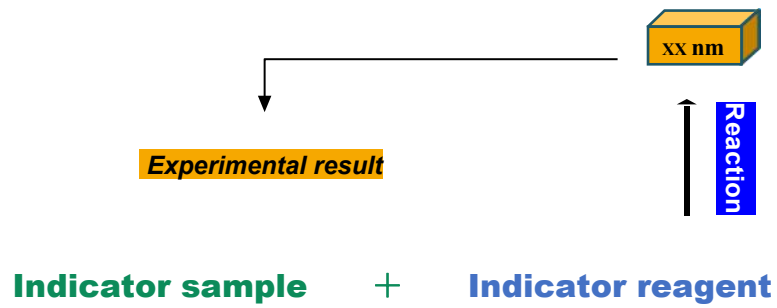


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## ABTS自由基检测试剂盒说明书

### 微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃避光保存	-

产品说明：

分解底物 ABTS 产生 ABTS 自由基，在 420nm 处的吸光系数远大于底物 ABTS，测定 ABTS 自由基的增加速率

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、天平、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水，水浴锅。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

1 组织：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。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2 细胞：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），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 4℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。

3 培养液：直接检测。

二、测定步骤：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 420nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、水浴锅温度调至 45℃。

3、工作液的配制：一瓶试剂二用 10mL 试剂一溶解。现用现配。

4、操作表：在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入下列试剂：

样本名称	测定管	空白管
样本 (μL)	30	
蒸馏水 (μL)	-	30
工作液 (μL)	170	170

在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后于 420nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 45°C 水浴 3min (酶标仪有控温功能的可以将温度调至 45°C)，拿出迅速擦干测定 190s 时的吸光值 A2，计算  $\Delta A$  测定管 = A2 测定 - A1 测定， $\Delta A$  空白管 = A2 空白 - A1 空白， $\Delta A = \Delta A$  测定管 -  $\Delta A$  空白管。空白管只需做一次。

### 三、漆酶活计算

#### 1. 按微量玻璃比色皿计算：

##### 1. 按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{ABTS能力 (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 61.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### 2. 按样本质量计算

酶活定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ABTS能力 (U/g 鲜重)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 61.7 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

##### 3. 按细胞数量计算

酶活定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位

$$\text{ABTS能力 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times 500 \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.123 \times \Delta A$$

##### 4. 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 液体每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{ABTS能力 (U/ mL)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 61.7 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ：ABTS 摩尔消光系数：36000L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；

V 反总：反应总体积，2×10<sup>-4</sup>L；V 样：反应中样本体积，0.03mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度需自行测定；W，样本质量，g；T：反应时间，3min。

#### 2. 按 96 孔板计算：

将上述计算公式中的 d=1cm 换为 d=0.6cm (96 孔板光径) 进行计算即可。

注意事项：

1. 工作液需临用前配制，并且尽快使用，4°C保存一周，若变色则不能使用。
2. 测定之前进行预实验，若吸光值较高，请将样品用提取液进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。

空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，OD 值变化不超过 0.05。