

总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, T-AOC) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

研究意义：

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。

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。

自备实验用品：

恒温水浴锅、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，使用前预冷。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，避光保存。

试剂二：液体 1.5mL×1 瓶，4°C避光保存。

试剂三：液体 1.5mL×1 瓶，避光保存。

混合液(现配现用)：将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合，使用前 37°C预温。

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°C，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°C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°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

操作步骤：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 593nm，蒸馏水调零。

2、操作表

	空白管	测定管
混合液 (μ L)	180	180
样品 (μ L)		6
双蒸水 (μ L)	24	18

充分混匀，反应 20min，于微量石英比色皿/96 孔板，测定 593nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$

注意：空白管只需测定一次。

总抗氧化能力计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.8442x - 0.0048$ ， $R^2 = 0.9979$

(1) 按样本质量计算

单位定义：每 g 样本每分钟产生 $1\mu\text{mol}Fe^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按细胞计算

单位定义：每万个细胞每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量} \\ &\quad \text{(万个)}) \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

单位定义：每毫升样本每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/mL)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，6 μ L；T：反应时间，20min；

W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.4221x - 0.0048$ ； $R^2 = 0.9979$

(1) 按样本质量计算

单位定义：每 g 样本每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按细胞计算

单位定义：每万个细胞每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量} \\ &\quad \text{(万个)}) \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

单位定义：每毫升样本每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/mL)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A + 0.0048) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，6 μ L；T：反应时间，20min；

W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL

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。

