

## 总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10286

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

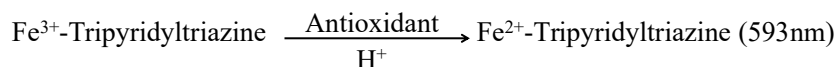
溶液的配制：

- 1、提取液：使用前置于 2-8°C 冰箱或冰上预冷；
- 2、标准品：10 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。临用前加入 0.9 mL 蒸馏水，20μL 浓硫酸，配制成 40 μmol/mL FeSO<sub>4</sub> 标准溶液备用；
- 3、混合液：将试剂一、试剂二、试剂三按 7:1:1 的比例混合，现配现用，用多少配多少。使用前置于 37°C 水浴锅或 37°C 恒温培养箱中预热 10min。

产品说明：

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。

在酸性环境下，还原 Fe<sup>3+</sup>-三吡啶三吡嗪(Fe<sup>3+</sup>-TPTZ)产生蓝色的 Fe<sup>2+</sup>-TPTZ 的能力反映了总抗氧化能力。



技术指标：

最低检出限：0.000567243 μmol/mL

线性范围：0.00078125-0.1 μmol/mL

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、低温离心机、细胞超声破碎仪、研钵/匀浆器、浓硫酸、冰和蒸馏水。

操作步骤：

## 一、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、血清、血浆、唾液或尿液样本

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、唾液或尿液样本直接用于测定，也可以-80℃冻存（不宜超过 30d）后再测定。

### 2、细胞或细菌样本

收集细胞或细菌于离心管中。按照细胞或细菌数量（ $10^4$ ）：提取液体积（mL）为 500~1000:1 的比例，加入 1.0mL 预冷的提取液（建议取 500 万细胞，加入 1mL 预冷的提取液），超声破碎细胞（功率 200W，超声开 3s，关 9s，总时间 3min），然后 10000rpm，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

### 3、组织样本

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 预冷的提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000rpm，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

## 二、测定步骤

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

2、标准溶液的制备：将 40  $\mu\text{mol/mL}$  标准溶液用蒸馏水稀释为 0.15、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156 $\mu\text{mol/mL}$  标准溶液备用。

3、标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）	标准液体积（ $\mu\text{L}$ ）	蒸馏水体积（ $\mu\text{L}$ ）	稀释后浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）
1	40	50	950	2
2	2	75	925	0.15
3	2	50	950	0.1
4	0.1	200	200	0.05
5	0.05	200	200	0.025
6	0.025	200	200	0.0125
7	0.0125	200	200	0.00625
8	0.00625	200	200	0.003125

备注：实验中每个标准管需 100 $\mu\text{L}$  标准溶液。

4、吸取 100 $\mu\text{L}$  标准溶液（蒸馏水作空白）加入 100 $\mu\text{L}$  试剂二，充分混匀，反应 10min，测定 593nm 下的吸光度，计算  $\Delta A$  标准 = A 标准 - A 空白，此时  $\text{Fe}^{2+}$  终浓度为 0.075、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156、0.00078  $\mu\text{mol/mL}$ ，标准曲线只需做 1-2 次。

### 5、操作表

试剂名称	空白管	测定管
混合液（ $\mu\text{L}$ ）	180	180
样本（ $\mu\text{L}$ ）	-	6
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）	24	18

充分混匀，室温准确反应 10min，吸取 200 $\mu\text{L}$  于微量玻璃比色皿/96 孔板，测定 593nm 吸光值。计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 空白，空白管只需测 1-2 次。

## 三、总抗氧化能力计算公式

### 1、标准曲线绘制

根据  $\text{Fe}^{2+}$  终浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度  $\Delta A$  标准（y， $\Delta A$  标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将  $\Delta A$  测

定 (y, ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

## 2、计算公式:

单位定义: 样本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 (μmol/mL) 表示。

### (1) 按蛋白浓度计算

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

### (2) 按样本质量计算

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

### (3) 按细胞数量计算

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

### (4) 按液体体积计算

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

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; V 反总: 反应总体积, 0.204mL; V 样: 反应中样本体积, 0.006mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10<sup>4</sup> 为单位, 以万计。

## 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显示产生干扰。
3. 样本中不宜添加 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. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。注意同步修改计算公式。

## 实验实例:

1. 取 0.1g 三叶草叶片加入 1mL 预冷的提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.490-0.139=0.351, 带入标曲 y=14.039x-0.0029, 得出 x=0.025, 按样本质量计算得: 总抗氧化能力 (μmol/g 质量) = 34 × x ÷ W = 34 × 0.025 ÷ 0.1 = 8.5 μmol/g 质量。

## 相关发表文献:

- [1] An W, Zhang Y, Zhang X, et al. Ocular toxicity of reduced graphene oxide or graphene oxide exposure in mouse eyes[J]. Experimental eye research, 2018, 174: 59-69.
- [2] Zhang S, He Y, Sen B, et al. Alleviation of reactive oxygen species enhances PUFA accumulation in Schizochytrium sp. through regulating genes involved in lipid metabolism[J]. Metabolic engineering communications, 2018, 6: 39-48.
- [3] Liu S, You L, Zhao Y, et al. Wild Lonicera caerulea berry polyphenol extract reduces cholesterol accumulation and enhances antioxidant capacity in vitro and in vivo[J]. Food Research International, 2018, 107: 73-83.
- [4] Z Zhang, H Liu, C Sun, et al. A C2H2 zinc-finger protein OsZFP213 interacts with OsMAPK3 to enhance salt tolerance in rice. Journal of plant Physiology. October 2018; 100-110.(IF7.394)
- [5] Esmail S. Kakey, Amez A. Ismael. Evaluation of Oxidative Stress Status in Aged Human in relation to some Diseases. International Conference on Pure and Applied Sciences. August 2018

**参考文献:**

[1] Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, et al. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays[J]. *Molecular nutrition & food research*, 2006, 50(11): 1030-1038.