

# 总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒说明书 (ABTS 法)

( 微板法 96 样 )

## 一、产品简介:

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的ABTS<sup>+</sup>, 在抗氧化物存在时 ABTS<sup>+</sup> 的产生会被抑制, 在734nm 或414nm 测定ABTS<sup>+</sup>的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种维生素E 的类似物, 具有和维生素E 相近的抗氧化能力, 用作其它抗氧化物总抗氧化能力的参考。

## 二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂mg×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加0.98mL蒸馏水, 充分溶解备用。
试剂二	粉剂mg×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加2.86mL蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂mg×1支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

工作液配置: 临用前将加水溶解后的试剂一和试剂二按照1:1比例混合, 避光反应12h后(二天内用完), 再稀释40倍备用, 当待检测样品为水溶性样品时, 用PBS 或蒸馏水稀释; 当待检测样品为非水溶性样品时, 用80%乙醇或无水乙醇稀释(最好现配现用)。

## 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、无水乙醇和蒸馏水。

## 四、总抗氧化能力测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

注: 样品中不能添加 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的物质, 也不宜添加 Tween、Triton和 NP-40 等去垢剂。

### 1、样本制备:

#### ①组织样本:

称取约0.1g 组织, 加入1mL 的冷PBS (水溶性样本)或80%乙醇(非水溶性样本), 进行冰浴匀浆, 匀浆后转入离心管中。12000rpm,4℃ 离心10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取。

#### ②细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取500万细菌或细胞加入1mL 的80%乙醇(自备)进行匀浆; 匀浆后转入2mL离心管中; 于60℃, 200-300W条件下超声提取30min (间隔5min 振荡混匀一次); 12000rpm, 离心10min, 取上清置冰上待测。

【注】:若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10<sup>6</sup>个):提取液 (mL) 为1000~5000:1比例进行提取。

#### ③液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

### 2、上机检测:

①酶标仪预热30min 以上, 调节波长至414nm。

②不同样本清除能力不一, 可先选取2个样本做检测, 若A 测定-A 对照接近零, 需对样本进行稀释(稀释液与组织提取液一致, 即水溶性样本用PBS 或蒸馏水稀释, 非水溶性样本用80%乙醇稀释)后再检测, 稀释倍数D 代入公式计算。

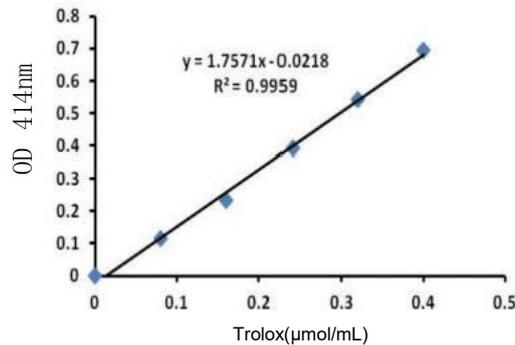
③在96孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管(做一次)
样本	10	10	
PBS或80%乙醇		190	10
工作液	190		190
混匀, 室温(25℃)避光静置6min, 于414nm处读取吸光值A, $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ 。			

【注】若一次性样本较多, 可用排枪或者分批检测, 以使测定管的反应时间(避光静置6min)保持一致。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 1.7571x - 0.0218$ ,  $x$  是标准品Trolox 摩尔浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  是 $\Delta A$ 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0218) \div 1.7571 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.57 \times (\Delta A + 0.0218) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细菌或细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0218) \div 1.7571 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 569.1 \times (\Delta A + 0.0218) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、液体样本：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.0218) \div 1.7571 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.57 \times (\Delta A + 0.0218) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

$V^1$ --- 反应中样品体积, 10  $\mu\text{L}$ =0.01mL;

W--- 样品质量, g;

Trolox 分子量---250.29;

50---细菌或细胞总数, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (4  $\mu\text{mol/mL}$ ): 称取 2mg 标准品即Trolox 至一新EP管, 再加2mL 乙醇溶解充分溶解, 即4  $\mu\text{mol/mL}$  标准品, 备用。
- 2 把母液用相应的提取液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.4  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线; 本说明书中的标曲是用80%乙醇稀释得出, 若选取其他稀释液可选择重做标曲。