

总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒说明书（ABTS 法）

（货号：BP10004F 分光法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 $ABTS^+$ ，在抗氧化物存在时 $ABTS^+$ 的产生会被抑制，在 734nm 或 414nm 测定 $ABTS^+$ 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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 2 支	4℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.49mL 蒸馏水，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.45mL 蒸馏水，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

工作液配置：1. 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 20-40 倍备用（使 A 空白管在 1.0 ± 0.2 ）；
2. 当待检测样品为水溶性样品时，用 PBS 或蒸馏水稀释；
3. 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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、无水乙醇、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

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、样本提取：

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 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

③ 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 冷 PBS 或 80%乙醇进行匀浆；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），若有损失需用 PBS 或 80%乙醇定容至 1mL。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（ 10^4 个）：提取液（mL）为 1000~5000:1 比例进行提取。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 414nm，蒸馏水调零。

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。

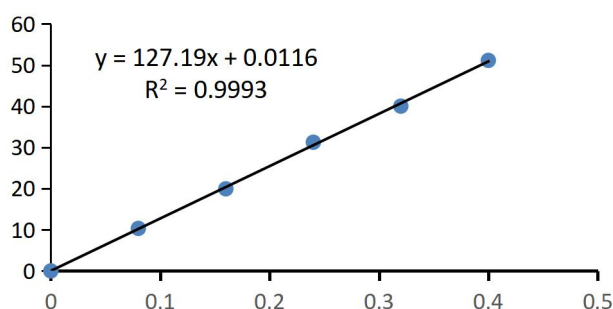
③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管	空白管（做一次）
样本	40	40	
PBS 或 80%乙醇		760	40
工作液	760		760
混匀，室温（25℃）避光静置 6min，所有液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，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： $y = 127.19x + 0.0116$ ，x 是标准品 Trolox 摩尔浓度（μmol/mL），y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0166) \div 127.19 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A - 0.0166) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0166) \div 127.19 \times V_1] \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A - 0.0166) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

4、液体体积：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A - 0.0166) \div 127.19 \times V_1] \div V_1 \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A - 0.0166) \times D \end{aligned}$$

5、按细胞/细菌数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0166) \div 127.19 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A - 0.0166) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---反应中样品体积，40 μ L=0.04 mL；
W---样品质量，g； Trolox 分子量---250.29。
D---稀释倍数，未稀释即为 1。 500---细菌或细胞总数，万；
Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 称取 2mg 标准品至一新 EP 管，再加 2mL 乙醇充分溶解，即得到 4 μ mol/mL 标准品母液；
- 3 将母液用乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.08，0.16，0.24，0.32，0.4. μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 乙醇，混匀得到 0.4 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
乙醇 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，计算各标品的清除率%，以标准品 Trolox 摩尔浓度 (μ mol/mL) 为 x， ΔA 为 y，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
无水乙醇		50
工作液	950	950
混匀，室温 (25 $^{\circ}$ C) 避光静置 6min，所有液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 414nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_0$ 浓度-A 标准。		