

ABTS 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: BP10027F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

ABTS 是一种介体物质, 用 $K_2S_2O_8$ 与 ABTS 直接生成稳定的阳离子自由基 $ABTS^+$, 抗氧化物质与 $ABTS^+$ 发生反应而使反应体系褪色。

$ABTS^+$ 自由基离子的最大吸收波长为 734nm, 所以, 用 A734 nm 可以检测 $ABTS^+$ 自由基离子的浓度。如果 A734nm 减小, 表明 $ABTS^+$ 自由基离子被清除, 进而对样本中 ABTS 清除能力进行定量分析。

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 3 支	4°C 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 0.5mL 蒸馏水溶解; 3. 溶解后的试剂一周内用完。
试剂二	粉剂 1 支	4°C 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°C 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 (二天内用完);

2. 反应结束后用无水乙醇稀释 20-30 倍备用, 使 A 空白管在 1.0 ± 0.2 ;

3. 工作液最好现配现用。

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、甲醇、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!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 新鲜组织或者称取约 0.05g 烘干样本 (将样本在 105°C 下杀青 3min, 然后 60°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 得到烘干样本), 加入 1mL 的 80% 甲醇提取液 (若鲜样需研磨均质), 于 60°C, 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 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【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 的 80% 甲醇提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 若有损失需用 80%

甲醇定容至 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：

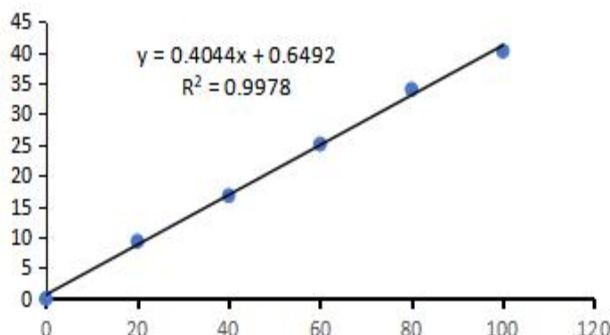
- ① 分光光度计预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 734nm，无水乙醇调零。
- ② 不同样本清除能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 测定-A 对照接近零，需对样本进行稀释（用 80%甲醇提取液稀释）后再检测，稀释倍数 D 代入公式计算。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（ μ L）	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
样本	50	50	
无水乙醇		950	50
工作液	950		950
混匀，室温（25℃）避光静置 6min，转移全部液体至玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 734nm 处读取吸光值 A。			

【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： $y = 0.4044x + 0.6492$ ，x 是标准品 Trolox 质量（ μ g/mL），y 是清除率（%）。



- 2、ABTS 自由基清除率(%)=[(1-(A 测定-A 对照)÷A 空白)×100]%
- 3、定义：用从标准曲线上获得的抗氧化剂Trolox的量来表示样本的ABTS自由基清除能力。
- 4、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) &= [(\text{清除率} - 0.6492) \div 0.4044 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 2.47 \times (\text{清除率} - 0.6492) \div W \times D \end{aligned}$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.6492) \div 0.4044 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D$$

- 5、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) &= [(\text{清除率} - 0.6492) \div 0.4044 \times V_1] \div (V_1 \div V \times C_{pr}) \times D \\ &= 2.47 \times (\text{清除率} - 0.6492) \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.6492) \div 0.4044 \times V_1] \div (V_1 \div V \times C_{pr}) \times D$$

- 6、按液体体积：

$$\begin{aligned} \text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) &= [(\text{清除率} - 0.6492) \div 0.4044] \times D \\ &= 2.47 \times (\text{清除率} - 0.6492) \times D \end{aligned}$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

ABTS 自由基清除能力($\mu\text{g Trolox/mL}$)= $[(70-0.6492)\div 0.4044]\times D$

5、按细菌或细胞数量计算:

ABTS 自由基清除能力($\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}$)= $[(\text{清除率}-0.6492)\div 0.4044\times V1]\div (V1\div V\times 500)\times D$
 $=2.47\times (\text{清除率}-0.6492)\div 500\times D$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

ABTS 自由基清除能力($\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}$)= $[(70-0.6492)\div 0.4044\times V1]\div (V1\div V\times 500)\times D$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, 50 μL =0.05 mL;

W---样品质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

Trolox 分子量---250.29;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

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 甲醇充分溶解, 即得到 1mg/mL 标准品母液;
- 3 将母液用甲醇稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 20, 40, 60, 80, 100. $\mu\text{g/mL}$ 。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 100 μL , 加入 900 μL 甲醇, 混匀得到 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
甲醇 μL	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 质量 ($\mu\text{g/mL}$) 为 x, 清除率%为 y, 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	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 $^{\circ}\text{C}$) 避光静置 6min, 转移全部液体至玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 734nm 处读取吸光值 A。		