

## PTIO 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: BP10030W-196 微板法 196 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) 又名 2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧代 3-氧化物, 主要用于测定生物样本和食品的抗氧化能力。

PTIO<sup>+</sup>·自由基离子的最大吸收波长为 557nm, 所以, 用 A557 nm 可以检测 PTIO<sup>+</sup>·自由基离子的浓度。如果 A557nm 减小, 表明 PTIO<sup>+</sup>·自由基离子被清除, 进而对样本中 PTIO 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                                                                                 |
|------|--------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 工作液  | 粉剂 2 瓶 | 4℃避光保存 | 每瓶:<br>1. 开盖前甩几下, 尽可能避免粉剂掉出;<br>2. 加入 22mL 80%甲醇水充分溶解(可超声 5min);<br>3. 溶解后的试剂一个月内用完。 |
| 标准品  | 粉剂 1 支 | 4℃保存   | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                        |

### 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、**甲醇**、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℃下杀青 3min, 然后 60℃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℃, 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<sup>4</sup>个): 提取液(mL)为 1000~5000: 1 比例进行提取。

#### 2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上(等待仪器过自检程序亦可), 调节波长至 557nm。

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。

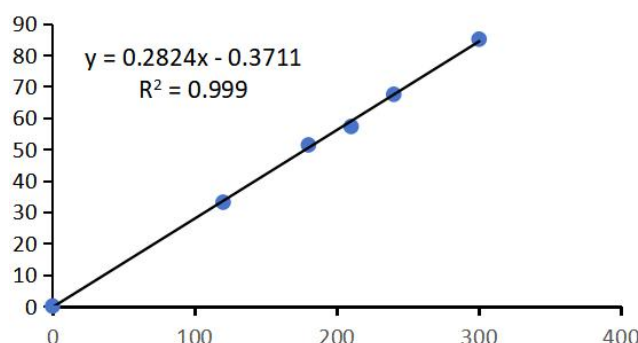
③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂组分 (μL)                            | 测定管 | 对照管 | 空白管 (仅做一次) |
|--------------------------------------|-----|-----|------------|
| 样本                                   | 100 | 100 |            |
| 80%甲醇                                |     | 200 | 100        |
| 工作液                                  | 200 |     | 200        |
| 混匀, 37℃避光静置 30min, 于 557nm 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 30min) 保持一致。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.2824x - 0.3711$ ,  $x$  是标准品 Trolox 质量 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $y$  是清除率 (%)。



2、PTIO 自由基清除率(%)=[(A 空白-(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的量来表示样本的PTIO自由基清除能力。

4、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\text{清除率} + 0.3711) \div 0.2824 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 3.541 \times (\text{清除率} + 0.3711) \div W \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(70 + 0.3711) \div 0.2824 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D$$

5、按蛋白含量计算:

$$\begin{aligned} \text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\text{清除率} + 0.3711) \div 0.2824 \times V1] \div (V1 \div V \times Cpr) \times D \\ &= 3.541 \times (\text{清除率} + 0.3711) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g/mg prot}) = [(70 + 0.3711) \div 0.2824 \times V1] \div (V1 \div V \times Cpr) \times D$$

6、液体样本:

$$\begin{aligned} \text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g/mL}) &= [(\text{清除率} + 0.3711) \div 0.2824] \times D \\ &= 3.541 \times (\text{清除率} + 0.3711) \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g/mL}) = [(70 + 0.3711) \div 0.2824] \times D$$

7、按细菌或细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\text{清除率} + 0.3711) \div 0.2824 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 3.541 \times (\text{清除率} + 0.3711) \div 500 \times D \end{aligned}$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(70 + 0.3711) \div 0.2824 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, 100μL=0.1 mL;

W---样品质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

抗坏血酸分子量---176.12;

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 在标准管中加 2mL 80%甲醇水充分溶解, 即得到 10mg/mL 标准品母液;
- 3 将母液用 80%甲醇水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 120, 180, 220, 240, 300.  $\mu\text{g/mL}$ 。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:

|                                                                                            |     |     |     |     |     |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1.吸取标准品母液 100 $\mu\text{L}$ , 加入 900 $\mu\text{L}$ 80%甲醇水, 混匀得到 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标品; |     |     |     |     |     |     |
| 2.再从中吸取 300 $\mu\text{L}$ 加入 700 $\mu\text{L}$ 80%甲醇水,混匀后得到 300 $\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu\text{g/mL}$                                                                   | 0   | 120 | 180 | 210 | 240 | 300 |
| 标品稀释液<br>$\mu\text{L}$                                                                     | 0   | 80  | 120 | 140 | 160 | 200 |
| 80%甲醇水<br>$\mu\text{L}$                                                                    | 200 | 120 | 80  | 60  | 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 ( $\mu\text{L}$ )                                                   | 标准管 | 空白管 (仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|------------|
| 标品                                                                       | 100 |            |
| 80%甲醇                                                                    |     | 100        |
| 工作液                                                                      | 200 | 200        |
| 混匀, 37°C避光静置 30min, 于 557nm 处读取吸光值 A, 根据 PTIO 自由基清除率(%)公式计算清除率%, 制作标准曲线。 |     |            |