

总酚（Total Phenols, TP）试剂盒说明书

(货号:BP10462W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

总酚是一类具有抗氧化和清除自由基功能的活性物质。本试剂盒采用福林酚法测定总酚含量, 在碱性条件下, 酚类物质将钨钼酸还原, 产生蓝色化合物, 在 760nm 处有特征吸收峰, 在 760nm 处的读取吸光值, 进而计算总酚含量。

二、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、60%乙醇、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

三、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 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。

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 新鲜样本(若水分充足, 可增加样本取样质量); 或者称取约 0.03g 烘干样本(将样本在 105℃下杀青 3min, 然后 60℃烘干至恒重, 粉碎, 过 40-60 目筛, 得到烘干样本), 加入 1.5mL 的 60%乙醇(若鲜样需研磨均质), 60℃振荡提取 2h(若蒸发用 60%乙醇定容至 1.5mL), 25℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清待测。

【注】:若样本量较少, 可同比例缩减样本量, 如取 0.02g 干样, 加入 1mL60%乙醇, 60℃振荡提取 2h。25℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清, 用 60%乙醇定容至 1mL 待测。

② 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/培养细胞:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中, 加入 1mL 的 60%乙醇, 60℃振荡提取 2h(若蒸发用 60%乙醇定容至 1mL), 25℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清待测。

【注】:若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500:1 比例进行提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min(等待仪器过自检程序亦可), 调节波长至 760nm。

② 对于总酚含量较高的样本如茶叶, 一般需用蒸馏水稀释后再检测如稀释 50 倍, 也可先选取 2 个样本做预测定, 找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分(μL)	测定管	空白管(仅做一次)
----------	-----	-----------

样本	10	
试剂一	50	50
混匀, 25°C室温条件下, 暗处静置 3min		
试剂二	50	50
蒸馏水	90	100
混匀, 25°C室温静置 30min, 全部液体转移至 96 孔板中, 测定 760nm 吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

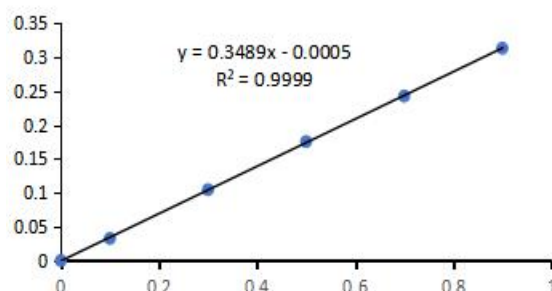
【注】:1.吸光值大于 1, 样品适当稀释再测定, 计算公式里乘以稀释倍数 D。

2.若 ΔA 在零附近, 可增加样本取样质量 W, 或加大样本上样量 V1 (如增至 30 μ L, 则蒸馏水相应减少, 保持总体积不变), 则改变后 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3.若待检测样本有强背景色 (如蓝色), 需做一个样本自身对照: 即试剂一用 50 μ L 蒸馏水替换, 其他步骤同测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照}}$ 。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.3489x - 0.0005$, x 是标准品质质量(μ g), y 是 ΔA 。



2、总酚 (TP) 含量(mg/g 干重) = $(\Delta A + 0.0005) \div 0.3489 \times 10^{-3} \div (V1 \div V \times W) \times D$
 $= 0.2866 \times (\Delta A + 0.0005) \times V \div W \times D$

3、总酚 (TP) 含量(mg/mg prot) = $(\Delta A + 0.0005) \div 0.3489 \times 10^{-3} \div (V1 \div V \times Cpr) \times D$
 $= 0.2866 \times (\Delta A + 0.0005) \times V \div Cpr \times D$

4、总酚 (TP) 含量(μ g/mL) = $(\Delta A + 0.0005) \div 0.3489 \div V1 \times D$
 $= 286.6 \times (\Delta A + 0.0005) \times D$

5、总酚 (TP) 含量(mg/ 10^4 cell) = $(\Delta A + 0.0005) \div 0.3489 \times 10^{-3} \div (V1 \div V \times 500) \times D$
 $= 0.2866 \times (\Delta A + 0.0005) \times V \div 500 \times D$

V---加入提取液体积;

V1---反应中样品体积, 0.01mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样品质量, g。

500---细菌或细胞总数, 万;

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. 制备标准品母液 (10mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 提取液 (60%乙醇), 超声完全溶解;
3. 将母液用 60%乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/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 50uL，加入 4.95mL60%乙醇，混匀得到 0.1 mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
60%乙醇 uL	400	320	240	160	80	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，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，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	10	
试剂一	50	50
混匀，25°C室温件下，暗处静置 3min		
试剂二	50	50
蒸馏水	90	100
混匀，25°C室温静置 30min，全部液体转移至 96 孔板中，测定 760nm 吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		