

总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, T-AOC) 试剂盒说明书

分光光度 50 管/48 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药理学研究中常常检测血浆、血清、唾液、尿液等各种体液，细胞或组织等裂解液、植物或中草药抽提液及各种抗氧化物(antioxidant)溶液的总抗氧化能力。

测定原理：

在酸性环境下，物质还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡啶(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 的能力反映了其总抗氧化能力。

自备实验用品：

可见分光光度计、恒温水浴锅、低温离心机、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，使用前预冷。

试剂一：液体 50mL×1 瓶，避光保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，避光保存。

样品的制备：

(1) 血清、血浆、唾液或尿液样品

血浆（制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝，不宜使用 EDTA 抗凝）4℃，5000rpm 离心 10min，取上清待测。血清、唾液或尿液样品直接用于测定，也可以-80℃冻存（不宜超过 30 d）后再测定。

(2) 组织样品

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

(3) 细胞样品

按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

操作步骤：

混合液(现配现用)：将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合，使用前预温至 37℃。

	空白管	测定管
混合液 (μL)	900	900
样品 (μL)		30

双蒸水 (μL)	120	90
充分混匀, 反应 20min, 双蒸水调零, 1mL 玻璃比色皿, 测定 593nm 处吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意: 空白管只需测定一次。

总抗氧化能力计算:

1.定义: 样品的抗氧化能力以达到同样吸光度变化值 (ΔA) 所需的标准液离子浓度表示。

标准曲线: $y=0.8442x-0.0048$, $R^2=0.9979$

2.计算公式:

(1)按蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 蛋白每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样品质量计算

单位定义: 每 g 样本每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

单位定义: 每万个细胞每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

单位定义: 每毫升样本每分钟产生 $1\mu\text{molFe}^{2+}$ -TPTZ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/mL)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.8442 \times 1000 \div T \\ &= 59.228 \times (\Delta A + 0.0048) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 样: 反应中样品体积, 0.03mL; T: 反应时间, 20min; W: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL

注意事项:

1. 试剂二对人体有刺激性, 请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 尽量避免使用在酸性条件下呈蓝色或接近蓝色的试剂, 否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
3. 样品中不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂和 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的还原剂。