

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

微量法100T/96S

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。

研究意义：

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，还原Fe³⁺-三吡啶三吡啶(Fe³⁺-TPTZ)产生蓝色的Fe²⁺-TPTZ的能力反映了总抗氧化能力。

自备实验用品：

恒温水浴锅、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，使用前预冷。

试剂一：液体15mL×1瓶，避光保存。

试剂二：液体1.5mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体1.5mL×1瓶，避光保存。

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37℃预温。

样品的制备：

(1) 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

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（10⁴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：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至593nm，蒸馏水调零。
2. 操作表

	空白管	测定管
混合液（ μ L）	180	180

样品 (μL)		6
双蒸水 (μL)	24	18
充分混匀，反应20min，于微量石英比色皿/96孔板，测定593nm吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意：空白管只需测定一次。

总抗氧化能力计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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

1. 按样本质量计算

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。

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

2. 按样本蛋白浓度计算

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。

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

3. 按细胞计算

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。

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

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。

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

$V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样品体积，6μL；T：反应时间，20min；W：样品质量，g； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.4221x - 0.0048$ ； $R^2 = 0.9979$

1. 按样本质量计算

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。

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \end{aligned}$$

2. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg蛋白每分钟产生1 μ molFe²⁺-TPTZ定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力 (U/mg prot)} &= (\Delta A+0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A+0.0048) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

3. 按细胞计算

单位定义：每万个细胞每分钟产生1 μ molFe²⁺-TPTZ定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力 (U/104cell)} &= (\Delta A+0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A+0.0048) \div \text{细胞数量 (万个)}\end{aligned}$$

3. 按液体体积计算

单位定义：每毫升样本每分钟产生1 μ molFe²⁺-TPTZ定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力 (U/mL)} &= (\Delta A+0.0048) \div 0.4221 \times 1000 \div T \\ &= 118.455 \times (\Delta A+0.0048)\end{aligned}$$

V_{样总}：加入提取液体积，1 mL；V_样：反应中样品体积，6 μ L；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。