

# 组织及血液总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA7-C48	组织及血液总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒	48T	常量法

## 产品说明:

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。

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

## 试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 35 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制:

- 1、提取液：使用前置于4℃冰箱或冰上预冷；
- 2、标准品：10 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 。临用前加入0.9 mL 蒸馏水，20  $\mu$ L 浓硫酸，配制成40  $\mu$ mol/mL  $FeSO_4$  标准溶液备用；
- 3、混合液：将试剂一、试剂二、试剂三按7:1:1的比例混合，现配现用，用多少配多少。使用前置于37℃水浴锅或37℃恒温培养箱中预热10min。

## 操作步骤:

### 一、样本处理

#### 1、血清、血浆、唾液或尿液样本

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）5000r/min 离心10min，取上清待测。血清、唾液或尿液样本直接用于测定，也可以-80℃冻存（不宜超过30d）后再测定。

#### 2、细胞或细菌样本

收集细胞或细菌于离心管中。按照细胞或细菌数量（ $10^4$ ）:提取液体积（mL）为500~1000:1的比例，加入1.0mL 预冷的提取液（建议取500万细胞，加入1mL 预冷的提取液），超声破碎细胞（功率200W，超声开3s，关9s，总时间3min），然后10000rpm，4℃离心10min，取上清置于冰上待测。

### 3、组织样本

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 预冷的提取液) 进行冰浴匀浆, 然后 10000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

### 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 593nm, 蒸馏水调零。

2、标准溶液的制备: 将 40 μmol/mL 标准溶液用蒸馏水稀释为 0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125 μmol/mL 标准溶液备用。

3、标准液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	40	50	950	2
2	2	100	1900	0.1
3	0.1	1000	1000	0.05
4	0.05	1000	1000	0.025
5	0.025	1000	1000	0.0125
6	0.0125	1000	1000	0.00625
7	0.00625	1000	1000	0.003125

备注: 实验中每个标准管需 500μL 标准溶液。

4、分别取 500μL 标准溶液 (蒸馏水作空白) 加入 500μL 试剂二, 充分混匀, 反应 10min, 测定 593nm 下的吸光度, 计算  $\Delta A$  标准 =  $A$  标准 -  $A$  空白, 此时  $Fe^{2+}$  终浓度为 0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156 μmol/mL。标准曲线只需做 1-2 次。

5、操作表:

试剂名称	空白管	测定管
混合液 (μL)	900	900
样本 (μL)	-	30
蒸馏水 (μL)	120	90

充分混匀, 室温准确反应 10min, 取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中测定 593nm 下的吸光度, 计算  $\Delta A$  测定 =  $A$  测定 -  $A$  空白, 空白管只需测 1-2 次。

### 三、总抗氧化能力计算

#### 1、标准曲线绘制

根据  $Fe^{2+}$  终浓度 (x, μmol/mL) 和吸光度  $\Delta A$  标准 (y,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线。  
根据标准曲线, 将  $\Delta A$  测

定 (y,  $\Delta A$  测定) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

#### 2、计算公式:

单位定义: 样本的抗氧化能力以达到同样吸光度变化值 ( $\Delta A$ ) 所需的标准液离子浓度 (μmol/mL) 表示。

##### (1) 按蛋白浓度计算

总抗氧化能力 (μmol/mg prot) =  $x \times V_{反总} \div (V_{样} \times C_{pr}) = 34 \times x \div C_{pr}$

##### (2) 按样本质量计算

总抗氧化能力 (μmol/g 质量) =  $x \times V_{反总} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) = 34 \times x \div W$

---

(3) 按细胞数量计算

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$ ) =  $x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = 34 \times x \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) =  $x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 34 \times x$

V 样总：加入提取液体积，1mL；V 反总：反应总体积，1.02mL；V 样：反应中样本体积，0.03mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细胞数量：以  $10^4$  为单位，万个。

**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样本，否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
3. 样本中不宜添加 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。
4. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。注意同步修改计算公式。