

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-M96	组织及血液总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒	96T	微量法

产品说明:

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。

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 100 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 2 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2-8℃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 μ L 浓硫酸，配制成40 μ 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、分光光度计或酶标仪预热30min 以上，调节波长至593nm，分光光度计用蒸馏水调零。

2、标准溶液的制备：将40 μmol/mL 标准溶液用蒸馏水稀释为0.15、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、 0.00156μmol/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	75	925	0.15
3	2	50	950	0.1
4	0.1	200	200	0.05
5	0.05	200	200	0.025
6	0.025	200	200	0.0125
7	0.0125	200	200	0.00625
8	0.00625	200	200	0.003125
9	0.003125	200	200	0.00156

备注：实验中每个标准管需 100μL 标准溶液。

4、吸取 100μL 标准溶液（蒸馏水作空白）加入 100μL 试剂二，充分混匀，反应 10min，测定593nm 下的吸光度， 计算 ΔA 标准=A 标准-A 空白，此时Fe²⁺终浓度为0.075、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156、0.00078 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)	180	180
样本(μL)	-	6
蒸馏水(μL)	24	18

充分混匀，室温准确反应 10min，吸取200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板，测定593nm 吸光值。计算 ΔA 测定= A 测定-A 空白，空白管只需测 1-2 次。

三、总抗氧化能力计算公式

1、标准曲线绘制

根据Fe²⁺终浓度(x, μmol/mL)和吸光度 ΔA 标准(y, ΔA 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定(y, ΔA 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(ΔA)所需的标准液离子浓度(μmol/mL)表示。

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(3) 按细胞数量计算

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

(4) 按液体体积计算

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

V 样总：加入提取液体积，1mL；V 反总：反应总体积，0.204mL；V 样：反应中样本体积，0.006mL；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，以万计。

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。