

总抗氧化能力(T-AOC) (FRAP 法)

规格: 分光光度法 48 样

编 号: TW54015

检测原理: FRAP 法

检测波长: 593nm

注 意:

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定;
- 2、为了您的安全和健康, 请佩戴好防护用具;

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, 抗氧化物质还原 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。

自备仪器和用品:

恒温水浴锅、低温离心机、可调式移液器、可见分光光度计、1mL 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

试剂清单:

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 60mL	x1	4°C	
试剂一	液体 50mL	x1	4°C	
试剂二	液体 5mL	x1	4°C,避光	
试剂三	液体 5mL	x1	4°C,避光	
标准品	粉剂	x1	4°C,避光	1mg Trolox 标准粉剂

样品提取 (按照步骤依次操作):**一、血清、血浆、唾液或尿液等液体样品**

- (1) 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°C, 5000rpm 离心 10min, 取上清待测;
- (2) 血清、唾液或尿液样品直接用于测定, 也可以-80°C冻存 (不宜超过 30 天) 后再测定;
- (3) 其他液体样品, 澄清可直接检测, 若浑浊则离心取上清检测;

二、组织样品

- 1、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;
- 2、然后 10,000g 离心力 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测;

三、细胞样品

- 1、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);
- 2、然后 10,000g 离心力 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测;

注意:

- 1、样本中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;
- 2、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;
- 3、样本中如果含有高浓度的铁盐或亚铁盐, 不宜使用本方法, 会干扰测定;
- 4、血清(浆)中铁离子或者亚铁离子的总浓度总是低于 $10\mu\text{M}$, 所以不会干扰到 FRAP 法测定;

实验准备：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 593nm，蒸馏水调零；
- 2、工作液的配制（按以下比例配制）：

试剂名称 (μL)	工作液 (960μL)
试剂一	800
试剂二	80
试剂三	80
混匀，避光 现用现配，2 小时内使用完 使用前 37℃预热	

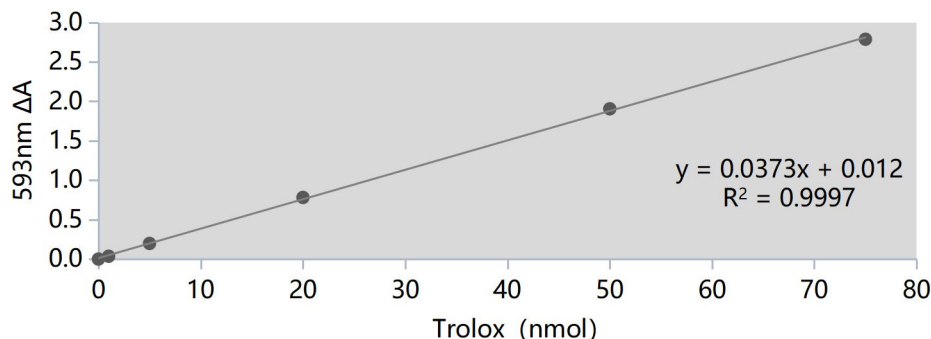
测定操作：

- 1、工作液置于 37℃预热（注意避光）；
- 2、在 1.5mL EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (*只做一管)
样本	50	-
提取液	-	50
工作液	950	950
充分混匀，室温 (25℃) 反应 10min 转移至 1mL 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)中 于 593nm 测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意：

- 1、若 $\Delta A > 2.8$ ，建议将样本稀释后测定，稀释倍数 D 代入公式计算；
- 2、若 $\Delta A < 0.01$ ，可增加样本量后测定；或者通过改变样本加样体积（如 100μL 样本+900μL 工作液，空白管等同）测定，样本加样体积(V1)代入公式重新计算；
- 3、工作液需要现用现配，2h 内使用完；
- 4、试剂二含有 TPTZ 对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内；

结果计算：**一、用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的总抗氧化能力****(1) 按照样本质量计算**

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.012) \div 0.0373 \times 10^{-3} \div V1] \div (W \div V2) \times D \\ &= 0.5362 \times (\Delta A - 0.012) \div W \times D\end{aligned}$$

(2) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.012) \div 0.0373 \times 10^{-3} \div V1] \div (500 \div V2) \times D \\ &= 0.5362 \times (\Delta A - 0.012) \div 500 \times D\end{aligned}$$

(3) 按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.012) \div 0.0373 \times 10^{-3} \div V1] \times Cpr \times D \\ &= 0.5362 \times (\Delta A - 0.012) \div Cpr \times D\end{aligned}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A - 0.012) \div 0.0373 \times 10^{-3} \div V1] \times D \\ &= 0.5362 \times (\Delta A - 0.012) \times D\end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

500: 细胞或细菌总数, 500 万;

V2: 加入提取液体积, 1mL;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

10^{-3} : nmol 到 μmol 的换算系数, 0.001;

W: 样本质量, g;

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

附：标准曲线的绘制（选做）

- 1、标准品^① 管中加入 1mL 提取液 40 度水浴 2 分钟充分溶解即为 4 $\mu\text{mol/mL}$ Trolox 溶液；
- 2、将标准品(4 $\mu\text{mol/mL}$) 使用提取液稀释为 1.5、1、0.5、0.2、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；
(也可根据自身实验需求调整标准品浓度)
- 3、依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线
 - 1) 工作液置于 37°C 预热（注意避光）
 - 2) 在 1.5mL EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	标准管	空白管 (*只做一管)
标准品	50	-
提取液	-	50
工作液	950	950
充分混匀，室温 (25°C) 反应 10min 转移至 1mL 玻璃/石英比色皿(光径 1cm)中 于 593nm 测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

加入反应体系中的标准品含量(nmol) = 标准品浓度($\mu\text{mol/mL}$) $\times V_1 \times 10^3$

^① 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖

V1: 加入反应体系中标准品体积, 0.05mL; 10^3 : μmol 到 nmol 的换算系数, 1000;

例如: 50 μL 标准品 (1.5、1、0.5、0.2、0.1 $\mu\text{mol/mL}$) 对应的 反应体系中的标准品含量为 (75、50、25、10、5 nmol)

以加入反应体系中的标准品含量 (nmol) 为横坐标 (x), 以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$) 为纵坐标 (y), 绘制拟合曲线, 即可得到线性方程 $y=kx+b$, 替代结果计算中的标准曲线方程;