

总抗氧化能力(T-AOC) (ABTS 法)

规格：分光光度法 48 样,带标准品

编号：TW54018

检测原理：ABTS 法

检测波长：734nm

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：

ABTS 法是使用最广泛的间接检测方法，可用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定。ABTS 经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基  $ABTS^{+}$ ，能溶于水相或酸性乙醇介质中，在 734nm 或 414nm 处有最大吸收。被测物质加入  $ABTS^{+}$  溶液后，所含抗氧化成分能与  $ABTS^{+}$  发生反应而使反应体系褪色。检测吸光度的变化，并以 Trolox 作为对照体系量化抗氧化物质的抗氧化能力。

自备仪器和用品：

恒温水浴锅、低温离心机、分光光度计、1mL 玻璃/石英比色皿和蒸馏水。

试剂清单：

| 试剂名称 | 规格      | 数目 | 贮藏    |                    |
|------|---------|----|-------|--------------------|
| 提取液  | 液体 60mL | x1 | 4℃    |                    |
| 试剂一  | 液体 60mL | x1 | 4℃,避光 |                    |
| 试剂二  | 粉剂      | x2 | 4℃,避光 |                    |
| 标准品  | 粉剂      | x1 | 4℃,避光 | 1mg Trolox<br>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℃，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℃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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测；

**注意：**

- 1、样本中尽量避免使用在中碱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；

## 实验准备：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 734nm；
- 2、工作液的配制：现配现用，临用前取试剂二一瓶，加入 25mL 试剂一，震荡混匀 20min 后，静置 取上清使用；

## 测定操作：

- 1、在 EP 管 或 1mL 玻璃/石英比色皿 中依次操作

| 试剂名称 (μL)                                                   | 测定管 | 对照管<br>(*选做) | 空白管<br>(*只做一管) |
|-------------------------------------------------------------|-----|--------------|----------------|
| 样本                                                          | 50  | 50           | -              |
| 提取液                                                         | -   | 950          | 50             |
| 工作液                                                         | 950 | -            | 950            |
| 充分混匀，室温避光反应 6min，<br>于 734nm 波长， <u>等体积提取液调零</u> ，测定各管吸光值 A |     |              |                |

## 注意：

- 1、如果样品在 734nm 检测有困难或受样品干扰，可尝试 414nm 检测；对于细胞或组织样品在 414nm 检测时，可能会因为样品本身的吸光度而对结果产生一定的干扰。
- 2、如测定 734nm 或 414nm 有困难，亦可在 725~745nm 或 400~425nm 范围测定；
- 3、有色样本可以设立对照管，无色样本可以不做对照管，建议预实验；
- 4、若 A 测定或(A 测定-A 对照) <0.3，说明清除能力过高，需对样本使用提取液稀释，稀释倍数 D 代入公式计算；
- 5、注意每孔操作间隔不易过长，若一次性样本较多，可用排枪或者分批检测；
- 6、试剂一含有 ABTS 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：**

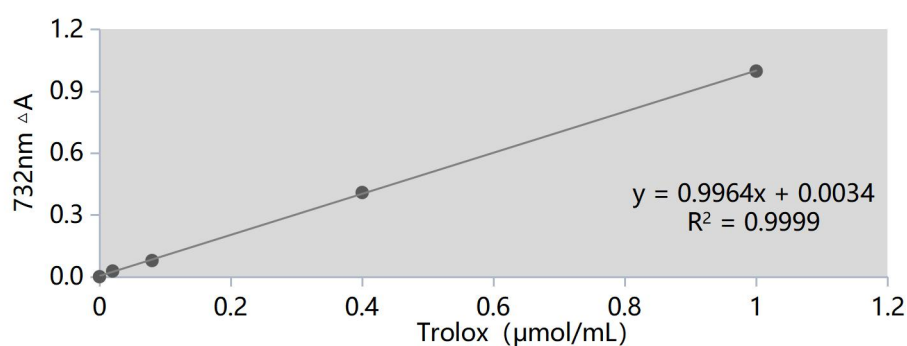
$$\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$$

或

$$\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$$

**一、以 ABTS 自由基清除率表示**

$$\text{ABTS 自由基清除率 (\%)} = \Delta A \div A_{\text{空白}} \times 100\%$$

**二、以 734nm 标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示****(1) 按样本质量计算**

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964] \times V \div W \times D \\ &= 1.0036 \times (\Delta A - 0.0034) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964 \times Mr] \times V \div W \times D \\ &= 251.1943 \times (\Delta A - 0.0034) \div W \times D \end{aligned}$$

**(2) 按样本蛋白浓度计算**

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964] \div C_{\text{pr}} \times D \\ &= 1.0036 \times (\Delta A - 0.0034) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964 \times Mr] \div C_{\text{pr}} \times D \\ &= 251.1943 \times (\Delta A - 0.0034) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

## (3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964] \times V \div 500 \times D \\ &= 1.0036 \times (\Delta A - 0.0034) \div 500 \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964 \times \text{Mr}] \times V \div 500 \times D \\ &= 251.1943 \times (\Delta A - 0.0034) \div 500 \times D\end{aligned}$$

## (4) 按液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964] \times D \\ &= 1.0036 \times (\Delta A - 0.0034) \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0034) \div 0.9964 \times \text{Mr}] \times D \\ &= 251.1943 \times (\Delta A - 0.0034) \times D\end{aligned}$$

V: 加入提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

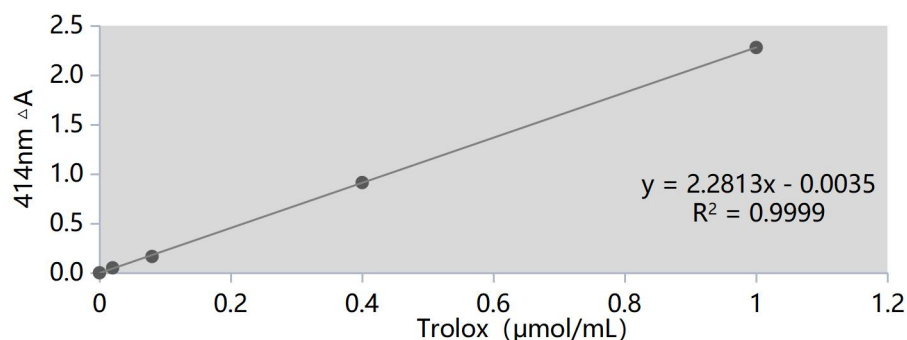
D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

500: 细胞数量(万个);

W: 样品质量, g;

Mr: Trolox 分子量, 250.29;

## 三、以 414nm 标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示



## (1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813] \times V \div W \times D \\ &= 0.4383 \times (\Delta A + 0.0035) \div W \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813 \times \text{Mr}] \times V \div W \times D \\ &= 109.7138 \times (\Delta A + 0.0035) \div W \times D\end{aligned}$$

## (2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813] \div \text{Cpr} \times D \\ &= 0.4383 \times (\Delta A + 0.0035) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813 \times \text{Mr}] \div \text{Cpr} \times D \\ &= 109.7138 \times (\Delta A + 0.0035) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

## (3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813] \times V \div 500 \times D \\ &= 0.4383 \times (\Delta A + 0.0035) \div 500 \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813 \times \text{Mr}] \times V \div 500 \times D \\ &= 109.7138 \times (\Delta A + 0.0035) \div 500 \times D\end{aligned}$$

## (4) 按液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813] \times D \\ &= 0.4383 \times (\Delta A + 0.0035) \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{总抗氧化能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 2.2813 \times \text{Mr}] \times D \\ &= 109.7138 \times (\Delta A + 0.0035) \times D\end{aligned}$$

V: 加入提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

500: 细胞数量(万个);

W: 样品质量, g;

Mr: Trolox 分子量, 250.29;

**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<sup>①</sup> 管中加入 1mL 提取液充分溶解即为 4 μmol/mL Trolox 溶液；
- 2、将标准品(4μmol/mL) 使用提取液稀释为 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0 μmol/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

| 试剂名称 (μL)                                                     | 标准管 | 空白管<br>(*只做一管) |
|---------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| 标准品                                                           | 50  | -              |
| 提取液                                                           | -   | 50             |
| 工作液                                                           | 950 | 950            |
| 充分混匀，室温避光反应 6min，<br>于 734nm 或 414nm 波长，等体积提取液调零<br>测定各管吸光值 A |     |                |

以标准品浓度 (μmol/mL) 为横坐标 (x)，以其对应的ΔA (ΔA =A 空白- A 标准) 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；

<sup>①</sup> 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖