

总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒（FRAP 法）说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D100212

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 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 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

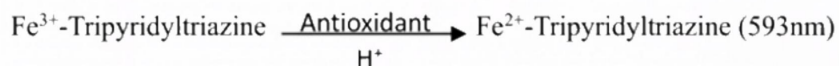
溶液的配制：

- 1、提取液：使用前置于 2-8℃冰箱或冰上预冷；
- 2、标准品：10 mg FeSO₄·7H₂O。临用前加入 0.9 mL 蒸馏水，20μL 浓硫酸，配制成 40 μmol/mL FeSO₄ 标准溶液备用，2-8℃保存 4 周；
- 3、混合液：根据样本量将试剂一、试剂二、试剂三=700μL:100μL:100μL（共 900μL，1T）的比例混合，现配现用。

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



技术指标：

最低检出限：0.00056 μmol/mL

线性范围：0.00078125-0.05 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅、低温离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、浓硫酸(>95%，AR)、冰和蒸馏水，

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 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。

注：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。

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 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液用蒸馏水稀释为 0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液备用。
- 3、标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
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：下述实验中每个标准管需 500 μL 标准溶液（注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度）。

- 4、分别取 500 μL 标准溶液（蒸馏水作空白）加入 500 μL 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 Fe^{2+} 终浓度为 0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156 $\mu\text{mol/mL}$ 。标准曲线只需做 1-2 次。
- 5、混合液使用前置于常温平衡 10min。
- 6、操作表：（在 EP 管中进行下述实验）

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，常温准确反应 10min，取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中测定 593nm 下的吸光度，计算 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

1、标准曲线绘制

根据 Fe^{2+} 终浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）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， $\mu\text{mol/mL}$ ）。

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 ($\mu\text{mol/mL}$) 表示。

(1) 按蛋白浓度计算

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

(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

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

(4) 按液体体积计算

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

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1.02mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.03mL; W : 样本质量, g; C_{pr} : 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. 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。

实验实例:

1. 取 0.1g 三叶草叶片加入 1mL 预冷的提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.909-0.148=0.761, 带入标曲 $y=21.056x-0.0087$, 得出 $x=0.037$, 按样本质量计算得:
总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $34 \times x \div W = 34 \times 0.037 \div 0.1 = 12.58 \mu\text{mol/g 质量}$ 。