

## 总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒

ABTS -微板法: 96T

### 一、试剂组成和配制:

试剂组成	试剂名称	96T	保存条件
试剂一	检测缓冲液	20ml×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	ABTS 溶液	1ml×1 支	-20℃,避光保存
试剂三	过氧化物溶液	0.5ml×1 支	-20℃ 保存
	试剂三应用液配制: 临用前按照 1:39 的比例用双蒸水(40 倍)稀释成应用液, 现用现配		
ABTS 工作液配制: 按照试剂一:试剂二:试剂三应用液=76:5:4 的比例配置成 ABTS 工作液, 用多少配多少, 室温避光保存, 30 分钟内使用完			
试剂四	试剂四应用液配制: 临用前按过氧化物酶: 试剂一 = 1:9 的比例(即倍)配成试剂四应用液, 现用现配		
试剂五	10mM Trolox 溶液	0.1ml×1 支	-20℃,避光保存
试剂盒附送 96 孔酶标板一块			

### 二、预期用途

用于血清、血浆、组织匀浆、细胞(或细胞上清)等中总抗氧化能力测定。

### 三、测定原理

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的  $ABTS \cdot +$ ，在抗氧化物存在时， $ABTS \cdot +$  的产生会被抑制，在 405nm 或 734nm 测定  $ABTS \cdot +$  的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种 VE 的类似物，具有和 VE 相近的抗氧化能力，用作其它抗氧化物总抗氧化能力的参考。例如，Trolox 的总抗氧化能力为 1，相同浓度情况下，其它物质的抗氧化能力用其抗氧化能力和 Trolox 相比的倍数来表示。



### 四、适用仪器

各种类型的酶标仪或者可以测定微量样本的分光光度计。

### 五、样本前处理

#### 1、血清(浆)、唾液、尿液、细胞上清等液体样本的制备：

血液样本采集后需及时分离血清或血浆，避免溶血，唾液、尿液、细胞上清等直接取样进行测定。血浆建

议肝素或柠檬酸钠抗凝，不宜采用 EDTA。

#### 2、组织样本：

准确称取组织重量，按重量 (g) : 体积(ml)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物，4℃，12000 转/分，离心 5 分钟，取上清测定。

#### 3、细胞样本

收集不少于 100 万细胞(建议细胞刮处理，不宜使用胰酶和 EDTA 消化)，加入 200  $\mu$ l 冰冷的 PBS，匀浆或超声以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物，4℃，12000 转/分，离心 5 分钟，取上清测定。

注:组织或细胞样本制成匀浆后需要测定其蛋白浓度，可以用我所 A045-2 考马斯亮蓝法蛋白定量测试盒或者 A045-3 的 BCA 法蛋白定量试剂盒测得。

### 六、操作步骤

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水 (ul)	10		
不同浓度的 MTrolox 溶液 (ul)		10	
待测样本 (ul)			10
试剂四应用液 (ul)	20	20	20
ABTS 工作液 (ul)	170	170	170
室温反应 6min, 波长 405nm (或在 405-425nm 内选), 酶标仪读取各孔 OD 值			

**注:** 反应完后尽快读数, 标准品 Trolox 溶液建议用蒸馏水稀释成 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0mM 浓度制作标准曲线。(标准曲线只需做一次) (见附录 1)

#### 附录 1: 标准曲线的制作

##### 1、前处理:

取 10mM Trolox 标准液用双蒸水稀释成: 0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.8mM、1.0 mM 制作标准曲线。

##### 2、操作表:

	空白孔	标准孔
蒸馏水 (ul)	10	
不同浓度标准应用液 (ul)		10
试剂四应用液 (ul)	20	20
ABTS 工作液 (ul)	170	170

室温反应 6min, 波长 405nm (或在 405-425nm 内选), 酶标仪读取各孔 OD 值

3、结果:

标准品浓度(mM)	OD 值
0	1.0324
0.1	0.9098
0.2	0.8132
0.4	0.6272
0.8	0.2706
1.0	0.1431