

总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒说明书（ABTS 法）

（微板法 96 样）

一、产品简介：

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 ABTS⁺，在抗氧化物存在时 ABTS⁺的产生会被抑制，在 734nm 或 414nm 测定 ABTS⁺的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种维生素 E 的类似物，具有和维生素 E 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。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 0.98mL 蒸馏水，充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 2.86mL 蒸馏水，充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

工作液配置：临用前将加水溶解后的试剂一和试剂二按照 1:1 比例混合，避光反应 12h 后（二天内用完），再稀释 40 倍备用，当待检测样品为水溶性样品时，用 PBSS 或蒸馏水稀释；当待检测样品为非水溶性样品时，用 80%乙醇或无水乙醇稀释（最好现配现用）。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、无水乙醇和蒸馏水。

四、总抗氧化能力测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

注：样品中不能添加 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的物质，也不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂。

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 的冷 PBS（水溶性样本）或 80%乙醇（非水溶性样本），进行冰浴匀浆，匀浆后转入离心管中。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

② 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 414nm。

② 不同样本清除能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 测定-A 对照接近零，需对样本进行稀释（稀释液与组织提取液一致，即水溶性样本用 PBS 或蒸馏水稀释，非水溶性样本用 80%乙醇稀释）后再检测，稀释倍数 D 代入公式计算。

③ 在 96 孔板中依次加入：

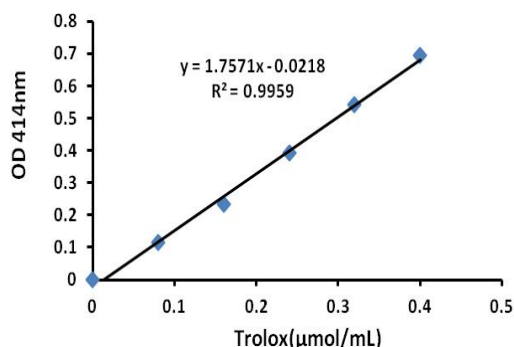
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	空白管（做一次）
样本	10	10	
PBS 或 80%乙醇		190	10
工作液	190		190
混匀，室温（25℃）避光静置 6min，于 414nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ 。			

【注】若一次性样本较多，可用排枪或者分批检测，以使测定管的反应时间（避光静置 6min）

保持一致。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 1.7571x - 0.0218$ ， x 是标准品 Trolox 摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)， y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0218) \div 1.7571 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.57 \times (\Delta A + 0.0218) \div W \times D \end{aligned}$$

3、液体样本：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) &= [(\Delta A + 0.0218) \div 1.7571 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.57 \times (\Delta A + 0.0218) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---反应中样品体积，10 μL =0.01 mL；

W---样品质量，g；

Trolox 分子量---250.29；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ($4\mu\text{mol/mL}$)：称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管，再加 2mL 乙醇溶解充分溶解，即即 $4\mu\text{mol/mL}$ 标准品，备用。
- 2 把母液用相应的提取液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, $0.4\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用 80% 乙醇稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。