

总抗氧化能力 (ABTS 法)试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

研究意义：

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 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。在 734nm 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。

自备实验用品：

恒温水浴锅、低温离心机、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 24mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃ 避光保存。

样品的制备：

(1) 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

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。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 d）后再测定。

(2) 组织样品

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，然后 10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

(3) 细胞样品

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）；10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

操作步骤：

1、酶标仪预热 30min，调节波长至 734nm。

2、工作液的配置：临用前取试剂二一瓶，加入 11mL 试剂一，震荡混匀 20min 后，静置，取上清使用。（注意，现配现用）

3、操作表（在 EP 管中反应）

	空白管	测定管
提取液（ μ L）	10	
样品（ μ L）		10
工作液（ μ L）	190	190
充分混匀，10min 内测定 734nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$		

注意：空白管只需测定一次，吸取工作液时不要吸到底部沉淀。

总抗氧化能力计算公式：

1、以自由基清除率表示：

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

2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：

$$\text{标准曲线: } y = 0.7021x - 0.0012 \quad R^2 = 0.9985 \quad \begin{array}{l} x: \text{Trolox 浓度}(\mu\text{mol/mL}) \\ y: \text{吸光值差值} \Delta A \end{array}$$

单位定义:以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的 ABTS 自由基清除能力。

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 0.7021 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 1.424 \times (\Delta A + 0.0012) \div W \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 0.7021 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) \\ &= 1.424 \times (\Delta A + 0.0012) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(3) 按细胞计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{cell}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 0.7021 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞} \\ &\quad \text{数量 (万个)}) \\ &= 1.424 \times (\Delta A + 0.0012) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/mL}) &= (\Delta A + 0.0012) \div 0.7021 \\ &= 1.424 \times (\Delta A + 0.0012) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，10 μ L；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL

注意事项：

1. 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。