

总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A015-1 比色法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否

则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

机体中有许多抗氧化物质,能使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物,通过比色可测出其抗氧化能力的高低。

二、测定意义:

机体防御体系的抗氧化能力的强弱与健康程度存在着密切联系,该防御体系有酶促与非酶促两个体系,许多酶是以微量元素为活性中心,例如:超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)等,非酶促反应体系中主要为维生素、氨基酸和金属蛋白质。例如:VE、胡萝卜素、VC、半胱氨酸、蛋氨酸、色氨酸、组氨酸、葡萄糖、铜兰蛋白、转铁蛋白、乳铁蛋白等。这个体系的防护氧化作用主要通过三条途径:(1)消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化;(2)分解过氧化物,阻断过氧化链;(3)除去起催化作用的金属离子。防御体系各成份之间相互起到了协同作用,以及代偿作用与依赖作用。

三、试剂组成及配制:

	试剂组成	A015-1-1 50 管/25 样	A015-1-2 100 管/50 样	保存条件
试剂一	无色液体	60mL×1 瓶	60mL×2 瓶	4℃
试剂二	白色晶体	粉剂×1 支	粉剂×2 支	4℃
试剂二应用配制: 每支粉剂加双蒸水 120mL 充分溶解(粉剂较难溶解,如需加快溶解,可以在 37℃ 水浴溶解),配好后可保存至少 1 个月				
试剂三	黄色贮备液	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃避光
	稀释液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	4℃
试剂三应用液: 取贮备液用稀释液以 1: 19 稀释, 现用现配				
试剂四	无色粘稠液体	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	室温
试剂五	无色透明液体	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	室温
试剂五天冷时会凝固, 测试前 37℃ 加热溶解直至澄清透亮方可使用				

四、所需仪器耗材及试剂:

含 520nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、37℃ 恒温水浴锅或气浴箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS(0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)。

五、操作步骤:

(一)、血清(浆)中 T-AOC 的测定(样本前处理详见附录 I):

1、操作表:

	测定管	对照管
试剂一 (mL)	1	1
血清(浆) (mL)	0.1	
试剂二应用液 (mL)	2	2
试剂三应用液 (mL)	0.5	0.5
旋涡混匀器充分混匀, 37℃ 水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
血清(浆) (mL)		0.1
混匀, 25~37℃ 放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值		

2、单位定义及计算公式:

①、定义: 在 37℃ 时, 每分钟每毫升血清(浆)使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位(U)。

②、计算公式:

$$\text{总抗氧化能力 (U / mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

T: 反应时间, 30min;

 $V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, mL; $V_{\text{样}}$: 取样量, mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

3、计算举例:

取血清 0.1mL 测总抗氧化能力, 以双蒸水调零, 测得对照管吸光度为 0.053, 测定管吸光度为 0.131。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力 (U / mL)} &= \frac{0.131 - 0.053}{0.01} \div 30 \times \frac{3.7}{0.1} \times 1 \\ &= 9.62 \text{ U / mL} \end{aligned}$$

(二)、组织中 T-AOC 的测定(样本前处理详见附录 I):

1、操作表:

	测定管	对照管
试剂一 (mL)	1	1
待测样本 (mL)	a*	
试剂二应用液 (mL)	2	2
试剂三应用液 (mL)	0.5	0.5
旋涡混匀器充分混匀, 37℃ 水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.2	0.2
待测样本 (mL)		a*
试剂五 (mL)	0.2	0.2
混匀, 25~37℃ 放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值		

* 参考取样量: 10%组织匀浆参考取样量: 0.1~0.2mL

2、单位定义及计算公式:

①、定义: 在 37℃ 时, 每分钟每毫克组织蛋白, 使反应体系的吸光度(OD)值, 每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位(U)。

②、计算公式:

$$\text{总抗氧化能力 (U / mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div \text{Cpr}$$

T: 反应时间, 30min;

 $V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, mL; $V_{\text{样}}$: 取样量, mL;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

(三)、全血中 T-AOC 的测定(样本前处理详见附录 I):

1、操作步骤:

(1)、前处理: 将全血按照一定比例用双蒸水进行破碎(一般按照全血: 双蒸水=1:9 处理), 制备溶血液, 待测。

(2)、操作表:

	测定管	对照管
试剂一 (mL)	1	1
待测样本 (mL)	0.05	
试剂二应用液 (mL)	2	2
试剂三应用液 (mL)	0.5	0.5
旋涡混匀器充分混匀, 37℃ 水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
待测样本 (mL)		0.05
混匀, 25~37℃ 放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值		

2、单位定义及计算公式:

①、定义: 在 37℃ 时, 每分钟每毫升全血, 使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位(U)。

②、计算公式:

总抗氧化能力
$$= \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

(U / mL)

T:反应时间,30min;
V_{反应}:反应体系总体积,mL;
V_样:取样量,mL;
N:样本测试前稀释倍数。

六、简便操作表:

混合试剂的配制: 试剂一 : 试剂二 : 试剂三 = 1 : 2 : 0.5 的比例进行配制, 现用现配(最好配完即用,剩余的丢弃)

1、血清 (浆)、全血简便操作表:

	对照管	测定管
待测样本 (mL)		0.1
混合试剂 (mL)	3.5	3.5
旋涡混匀器充分混匀, 37℃水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
待测样本 (mL)	0.1	
混匀, 25~37℃放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。		

2、组织样本简便操作表:

	对照管	测定管
组织匀浆 (mL)		a
混合试剂 (mL)	3.5	3.5
旋涡混匀器充分混匀, 37℃水浴 30 分钟		
试剂四 (mL)	0.2	0.2
组织匀浆 (mL)	a	
试剂五 (mL)	0.2	0.2
混匀, 25~37℃放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。		

附录 I : T-AOC 测定样本前处理

1、血浆样本前处理:

血浆在测试前 3500 转 / 分离心 10 分钟, 取上清待测, 否则有些抗凝剂会引起沉淀及混浊, 肝素抗凝的血浆不要离心, 血清不需要离心。

2、组织样本的前处理:

组织匀浆的制备:

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, 制备成 10%的匀浆液, 2500 转/分离心 10 分钟, 取上清液待测。同时用考马斯亮蓝法测定匀浆蛋白浓度。

3、培养细胞的前处理:

培养细胞悬液的制备:

将培养细胞消化, 离心, 弃上清, 留下层细胞, 用生理盐水或匀浆介质制备成 10⁷/cm³的悬液, 即 10⁷/mL 的悬液, 再进行破碎。破碎细胞的方法有三种: ①、用匀浆器匀浆。(可以用匀浆机, 也可以用玻璃匀浆器手工匀浆。) ②、用进口的超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次。(第③种方法有时会影响酶活力。) 制备好的细胞悬液不需要离心, 在测试加样前要摇匀后取样。同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白。

4、培养细胞的上清及部分体液均可以按照血清样本处理, 一般直接加样。

5、全血样本前处理: 一般用双蒸水 10 倍稀释, 具体稀释倍数及取样量要做预试。

注: 本试剂盒不建议使用酶标仪读数 (否则偏差较大), 如只有酶标仪, 可选购本所其他货号本指标产品 (如 A015-2-1 ABTS 法和 A015-3-1 FRAP 法)。