总抗氧化能力 (T-AOC) 检测试剂盒 (FRAP 微板法)

产品简介:

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 主要包括羟基自由基、超氧自由基和过氧化氢。在细胞或组织的正常生理代谢过程中会产生活性氧，同时一些环境因子例如紫外照射、环境污染等也可以诱导活性氧的产生，活性氧产生后可以导致细胞内脂、蛋白和 DNA 等的氧化损伤，诱发氧化应激 (Oxidative stress)，继而导致各种肿瘤、动脉粥样硬化、风湿性关节炎、糖尿病、肝损伤、以及中枢神经系统疾病等，机体中存在多种抗氧化物，包括抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶等，可以清除体内产生的各种活性氧，以阻止活性氧诱导的氧化应激 (oxidative stress) 的产生；一个体系内的各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总的水平即体现了该体系内的总抗氧化能力，因此测定血浆、血清、尿液、唾液等各种体液，细胞或组织等裂解液中的总抗氧化能力具有非常重要的生物学意义。

总抗氧化能力 (T-AOC) 检测试剂盒 (FRAP 微板法) 即 Total Antioxidant Capacity Assay Kit with FRAP method，简称 T-AOC Assay Kit，是一种采用铁离子还原能力 (Ferric Reducing Ability of Plasma,FRAP) 来测定样品抗氧化活性的方法，其原理是在酸性条件下样品中的抗氧化物质还原 Fe^{3+}-TPTZ 产生 Fe^{2+}-TPTZ，呈现出明显的蓝色 (紫色)，于 593nm 处有最大的光吸收，在 Fe^{3+}TPTZ 过量的情况下测定蓝色物质的生成量即可获得待测样品的还原能力即总抗氧化能力，由于反应在酸性条件下进行，可以抑制内源性的一些干扰因素，并且由于血浆等样品中的铁离子或亚铁离子的总浓度通常低于 10μM，因此血浆等样品中的铁离子或亚铁离子不会显著干扰 FRAP 法的检测反应，本方法可以对血浆、血清、尿液等各种体液，细胞或组织裂解液、植物或中草药抽提液或各种抗氧化物溶液的总抗氧化能力进行检测。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTO1005 100T	Storage
试剂 (A): 亚铁标准溶液 (10mM)	1ml	4℃
试剂 (B): FRAP Assay Buffer	30ml	RT
试剂 (C): TPTZ 溶液	3ml	4℃ 避光
试剂 (D): 氯化铁溶液	3ml	4℃
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、实验材料:植物组织(苹果、香蕉、玉米等)、血液、组织样本、蒸馏水等

2、研钵或匀浆器、水浴锅、离心机、离心管、酶标仪、 96 孔板、水浴锅或恒温箱

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

① 植物样品:取正常或特殊条件下的新鲜植物组织,洗净,擦干,切碎,迅速称取,按 0.5g 样品: 4.5ml蒸馏水的比例匀浆或研磨,离心 10min,上清液定容至 5ml 备用(亦可参考相关资料提取方法提取)。

② 血浆、血清和尿液样品:取样后可直接用本试剂盒进行测定。

③ 组织样品:精确称取 50mg 组织,加入 200μl 预冷的 PBS,超声或匀浆处理,充分破碎细胞使其抗氧化物释放出来,离心 5min,取上清备用。

④ 细胞样品:收集约 100 万个细胞(无需准确计数,直接刮下,不用消化处理),加入 200 μl 预冷的 PBS,超声或匀浆处理,充分破碎细胞使其抗氧化物释放出来,离心 5min,取上清备用。

⑤ 抗氧化物质:用水配制成 0.1~1.5mM,即可用于测定。

⑥ 组织或细胞样品需测定蛋白浓度,样品抗氧化能力较高,可用蒸馏水稀释后再次测定。

2、 FRAP 工作液制备:按 FRAP Assay Buffer: TPTZ 溶液:氯化铁溶液 =10:1:1 的比例配制,一般一个检测各试剂的用量分别为 220μl、 22μl、 22μl,该工作液宜 2 小时内用完。

3、 Fe^{2+} 标准梯度的制备:用蒸馏水将亚铁标准溶液 (10mM) 稀释至 0.05、 0.1、 0.3、 0.5、 0.7、 0.9、 1.2、 1.5mM ,$^{2+}$标准梯度宜新鲜配制, 1 周内使用。

4、加样:按照下表设置空白孔、标准孔、测定孔,溶液应按照顺序依次加入 96 孔板中,并注意避免产生气泡,小心混匀,然后置各管于 37℃ 水浴锅保温 30min,如果样品的吸光度值过高,可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定,样品的检测最好能设置平行管。

加入物 (ul)	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水	30	—	—
系列 Fe^{2+}标准 (1~8 号)	—	30	—
样品提取液	—	—	30
FRAP 工作液	264	264	264

5、测定:用酶标仪检测 593nm 处吸光度值,依次记为 $A_{空白}$ $A_{标准}$ $A_{测定}$

计算:

以系列 Fe^{2+}标准 (1~8 号)，即亚铁离子浓度(mM)为横坐标，相应吸光度为纵坐标，作出标准曲线。本方法是以 Fe^{2+}浓度来表示总抗氧化能力，因此，可根据提取液的吸光度在标准曲线上查出相应的 Fe^{2+}浓度，即可知道该样品的抗氧化能力。计算方法举例如下，

植物样品的吸光度值和 0.5mM 的 Fe^{2+}的吸光度值相同，则该血浆 (血清) 样品的总抗氧化能力为 0.5mM/(0.5g/5ml)=0.5mmol/100g；

血浆 (血清) 样品的吸光度值和 0.7mM 的 Fe^{2+}的吸光度值相同，则该血浆 (血清) 样品的总抗氧化能力为 0.7mM；

细胞 (组织) 匀浆样品的吸光度值和 0.3mM 的 Fe^{2+}的吸光度值相同，该匀浆液蛋白浓度为 0.2mg/ml，则该细胞 (组织) 样品的总抗氧化能力为 0.3mM/0.2mg/ml=0.15mmol/g；

0.3mM 的抗氧化物质，其吸光度值和 0.6mM 的 Fe2+ 的吸光度值相同，则其相对总抗氧化能力为 0.6mM/0.3mM=2 。

注意事项:

1、 实验材料应尽量新鲜，样品提取的整个过程最好在 4℃ 条件下进行；如取材后不能立即检测，也可以 -80℃ 冻存后再进行测定 (应在 1 个月内测定完毕)。

2、 亚铁标准溶液如变为黄色或棕黄色应弃用。

3、 测定 593nm 如有困难，亦可在 585~605nm 范围内进行测定。

4、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

5、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期: 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCDP0013	GUS 染色液 (即用型)
GCPE0025	SDS-PAGE 蛋白加样缓冲液 (5×, 含 DTT)
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCPW0053	Western 抗体洗脱液 (碱性)
GCTC1167	尿素 (Urea) 检测试剂盒 (脲酶波氏比色法)

附录 1 :标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，对系列标准进行吸光度的测定，其数值及标准曲线如下（仅供参考）：

Fe^{2+}浓度(mM)	0	0.05	0.1	0.3	0.5
吸光度	0.078	0.171	0.268	0.626	0.977
Fe^{2+}浓度(mM)	0.7	0.9	1.2	1.5	1.8
吸光度	1.359	1.719	2.3	2.639	2.897



