总抗氧化能力（FRAP 法）试剂盒说明书

可见分光光度法 50T/48S

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：

在酸性环境下， 抗氧化物质还原 Fe^{3+}-三吡啶三吖嗪(Fe^{3+}-TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+}-TPTZ 的能力反映了总抗氧化能力。

自备实验用品：

恒温水浴锅、低温离心机、分光光度计、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，使用前预冷。

试剂一：液体 50 mL×1 瓶， 避光保存。

试剂二：液体 5 mL×1 瓶， 4℃避光保存。

试剂三：液体 5 mL×1 瓶， 避光保存。

混合液(现配现用)：将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合，使用前 37℃预温。

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、 分光光度计预热 30min，调节波长至 593nm。

2、操作表

	空白管	测定管
样品（μL）		50
提取液（μL）	50	
混合液（μL）	950	950
充分混匀，反应 20min，于 1mL 玻璃比色皿，测定 593nm 吸光值， $\triangle A = A_{测定} - A_{空白}$		

注意： 空白管只需测定一次，若测定管吸光值大于 2 则需要用提取液稀释。

总抗氧化能力计算公式：

标准曲线： $y = 2.4832x + 0.0134$ $R^2 = 0.9996$ x:Trolox 浓度(μmol/mL)
y:吸光值差值△A

单位定义:用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的总抗氧化能力。

（1）按样本质量计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/g 鲜重）=(△A-0.0134）÷2.4832×V 样÷(V 样÷V 样总×W)
=0.4027×（△A-0.0134）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/mg prot）=(△A-0.0134）÷2.4832×V 样÷(V 样÷V 样总×Cpr)
=0.4027×（△A-0.0134）÷Cpr

（3）按细胞计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/10^4cell）=(△A-0.0134）÷2.4832×V 样÷（V 样÷V 样总×细胞数量（万个））
= 0.4027×（△A-0.0134）÷ 细胞数量（万个）

（4）按液体体积计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/mL）=(△A-0.0134）÷2.4832
=0.4027×（△A-0.0134）

V 样总：加入提取液体积， 1 mL；V 样： 反应中样品体积， 50μL；W：样品质量， g；
Cpr：样本蛋白浓度， mg/mL

注意事项：

1. 试剂二对人体有刺激性， 请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 尽量避免使用在酸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。
3. 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。