总抗氧化能力 (ABTS 法)试剂盒说明书

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：

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、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， 4℃保存。

试剂一：液体 60mL×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、 分光光度计预热 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 25mL 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（μL）	50	
样品（μL）		50
工作液（μL）	950	950
充分混匀， 10min 内测定 734nm 吸光值，$\triangle A = A_{空白} - A_{测定}$		

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，若 $A_{测定}$小于 0.4，需用提取

液稀释后检测。

总抗氧化能力计算公式：

1、以自由基清除率表示：

ABTS 自由基清除率（%）=（A 空白-A 测定）÷A 空白×100%

2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：

标准曲线： y = 1.4042x - 0.0012 R^2 = 0.9985 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ABTS 自由基清除能力。

（1）按样本质量计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/g 鲜重）=(△A+0.0012）÷1.4042×V 样÷(V 样÷V 样总×W)

=0.712×(△A+0.0012）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/mg prot）=(△A+0.0012）÷1.4042×V 样÷(V 样÷V 样总×Cpr)

=0.712×(△A+0.0012）÷Cpr

(3) 按细胞计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/10^4cell）=(△A+0.0012）÷1.4042×V 样÷（V 样÷V 样总×细胞数量（万个））

= 0.712×(△A+0.0012）÷ 细胞数量（万个）

（3）按液体体积计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/mL）=(△A+0.0012）÷1.4042

=0.712×(△A+0.0012）

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. 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。