

总抗氧化能力 (T-AOC)测定试剂盒

(货号: BC040 ABTS 微板法)

一、测定意义及原理

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。

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。

二、试剂组成及配制

	试剂组成	100 管/50 样	50 管/25 样	保存条件
试剂一	无色液体	60ml*2 瓶	60ml*1 瓶	2~8°C 保存
试剂二	白色晶体	粉剂*2 支	粉剂*1 支	2~8°C 保存
试剂二应用配制: 每支粉剂加双蒸水 120ml 充分溶解 (粉剂比较难溶, 如需加快溶解, 可以在 37°C 水浴溶解)				
试剂三	黄色贮备液	5ml*1 瓶	3ml*1 瓶	2~8°C 避光保存
	稀释液	60ml*1 瓶	30ml*1 瓶	2~8°C 保存
试剂三应用液配制: 用前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	24ml*1 瓶	12ml*1 瓶	室温保存
试剂五	无色透明液体	24ml*1 瓶	12ml*1 瓶	室温保存
试剂五天冷时会凝固, 测试前 37°C 水浴, 溶解直至澄清透亮方可使用				



三、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)	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°C 水浴 30 分钟		
试剂四 (ml)	0.1	0.1
血清(浆) (ml)		a*

混匀, 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: 血清(血浆) 为 0.1ml

2、单位定义及计算公式:

①、定义: 在 37°C 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。

②、计算公式

$$\text{总抗氧化能力 (单位/毫升血清)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取液量}} \times \text{样本测试前稀释倍数 (N倍)}$$

(二)、组织中 T-AOC 的测定(样本前处理详见附录 I):

	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°C 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, 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°C 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。

②、计算公式:

$$\text{总抗氧化能力 (单位/毫克蛋白)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取液量}} \div \text{匀浆液蛋白浓度 (mgprot/ml)}$$

③、示例:

取 10%大鼠肺组织匀浆 0.15ml 测总抗氧化能力, 测得对照管吸光度为 0.050, 测定管吸光度为 0.214, 蛋白浓度为 10.5mgprot/ml。则计算结果为:

$$(0.214 - 0.050) \div 30 \times (4.05 / 0.15) \div 10.5 = 1.41 \text{ 单位/毫克蛋白}$$



(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: 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)	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°C水浴 30 分钟		
试剂四(ml)	0.1	0.1
待测样本(ml)		a*

混匀, 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: 全血一般用双蒸水 1: 9 稀释取 0.05ml。

2、单位定义及计算公式:

①定义: 在 37°C 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。

$$\text{总抗氧化能力 (单位/毫升全血)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取液量}} \times \text{样本测试前稀释倍数 (N倍)}$$

四、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, 现用现配

1、血清 (浆)、全血简便操作表:

	对照管	测定管
待测样本 (ml)		a
混合试剂 (ml)	3.5	3.5
旋涡混匀器充分混匀, 37°C水浴 30 分钟		
试剂四 (ml)	0.1	0.1
待测样本 (ml)	a	

混匀, 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
待测样本 (ml)		a
混合试剂 (ml)	3.5	3.5
旋涡混匀器充分混匀, 37°C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, 放置 10 分钟, 波长 520nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。



五、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 $10^7/\text{cm}^3$ 的悬液,即 $10^7/\text{ml}$ 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匀浆蛋白。

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。

