总抗氧化能力（T-AOC）试剂盒说明书（ABTS 法）

（分光法 48 样）

一、产品简介：

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 $ABTS^{+}$，在抗氧化物存在时 $ABTS^{+}$的产生会被抑制，在 734nm 或 414nm 测定 ABTS+的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种维生素 E 的类似物，具有和维生素 E 相近的抗氧化能力，用作其它抗氧化物总抗氧化能力的参考。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 1.47mL 蒸馏水，充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 2.86mL 蒸馏水，充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

工作液配置：临用前将加水溶解后的试剂一和试剂二按照 1:1 比例混合，避光反应 12h 后（二天内用完），再稀释 40 倍备用，当待检测样品为水溶性样品时，用 PBS 或蒸馏水稀释；当待检测样品为非水溶性样品时，用 80%乙醇或无水乙醇稀释（最好现配现用）。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、无水**乙醇**和蒸馏水。

四、总抗氧化能力测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

注：样品中不能添加 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的物质，也不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂。

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 的冷 PBS（水溶性样本）或 80%乙醇（非水溶性样本），进行冰浴匀浆，匀浆后转入离心管中。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 的 80%乙醇（自备）进行匀浆；匀浆后转入 2mL 离心管中；于 60℃，200-300W 条件下超声提取 30min（间隔 5min 振荡混匀一次）；12000rpm，离心 10min，取上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4个）：提取液（mL）为 1000~5000: 1 比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 414nm，蒸馏水调零。

② 不同样本清除能力不一，**可先选取** 2 个样本做检测，若 A 测定-A 对照接近零，需对样本进行稀释（稀释液与组织提取液一致，即水溶性样本用 PBS 或蒸馏水稀释，非水溶性样本用 80%乙醇稀释）后再检测，稀释倍数 D 代入公式计算。

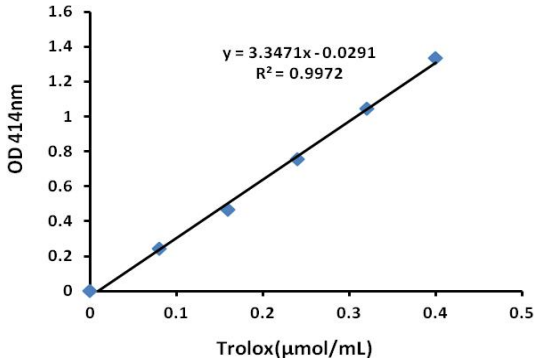
③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管（做一次）
样本	40	40	
PBS 或 80%乙醇		760	40
工作液	760		760
混匀，室温（25℃）避光静置 6min，所有液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 414nm 处读取吸光值 A，△A=A 空白-（A 测定-A 对照）。			

【注】若一次性样本较多，可用排枪或者分批检测，以使测定管的反应时间（避光静置 6min）保持一致。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 3.3471x-0.0291，x 是标准品 Trolox 摩尔浓度（μmol/mL），y 是△A。



2、按样本质量计算：

总抗氧化能力(μmol Trolox/g 鲜重)=[(△A+0.0291)÷3.3471×V1]÷(V1÷V×W)×D

=0.3×(△A+0.0291)÷W×D

3、按样本质量计算：

总抗氧化能力(nmol Trolox/10^4 cell)=[(△A+0.0291)÷3.3471×V1×10^3]÷(V1÷V×500)×D

=298.8×(△A+0.0291)÷500×D

4、液体样本：

总抗氧化能力(μmol Trolox/mL)=[(△A+0.0291)÷3.3471×V1]÷V1×D

=0.3×(△A+0.0291)×D

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---反应中样品体积，40μL=0.04 mL；

W---样品质量，g；　　Trolox 分子量---250.29。

500---细菌或细胞总数，万；　　D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

1　制备标准品母液（4μmol/mL）：称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管，再加 2mL 乙醇溶解充分溶解，即即 4μmol/mL 标准品，备用。

2　把母液用相应的提取液稀释成以下浓度梯度的标准品：0，0.08，0.16，0.24，0.32，0.4μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3　按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。