

总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒（FRAP 法）说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1315

规格：100T/96S、200T/192S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	100T 规格	200T 规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	液体 110 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃保存

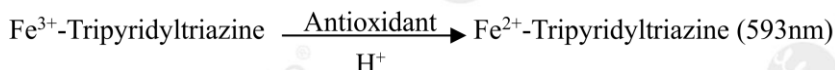
溶液的配制：

- 1、提取液：使用前置于 2-8℃冰箱或冰上预冷；
- 2、标准品：10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。临用前加入 0.9 mL 蒸馏水，20 μL 浓硫酸，配制成 40 $\mu\text{mol/mL}$ FeSO_4 标准溶液备用，2-8℃保存 4 周；
- 3、混合液：根据样本量将试剂一、试剂二、试剂三=700 μL :100 μL :100 μL （共 900 μL ，5T）的比例混合，现配现用。

产品说明：

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。

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



技术指标：

最低检出限：0.000567243 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围：0.00078125-0.1 $\mu\text{mol/mL}$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、低温离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、浓硫酸 (>95%，AR)、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





- 1、血清、血浆、唾液或尿液样本：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）5000r/min 离心 10min，取上清待测。血清、唾液或尿液样本直接用于测定，也可以-80℃冻存（不宜超过 30d）后再测定。
- 2、细胞或细菌样本：收集细胞或细菌于离心管中。按照细胞或细菌数量（ 10^4 ）：提取液体积（mL）为 500~1000:1 的比例，加入 1.0mL 预冷的提取液（建议取 500 万细胞，加入 1mL 预冷的提取液），超声破碎细胞（功率 200W，超声开 3s，关 9s，总时间 3min），然后 10000rpm，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 3、组织样本：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 预冷的提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000rpm，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

注：样本中不宜添加 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。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 593nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的制备：将 40 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液用蒸馏水稀释为 0.15、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液备用。
- 3、标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	40	50	950	2
2	2	75	925	0.15
3	2	50	950	0.1
4	0.1	200	200	0.05
5	0.05	200	200	0.025
6	0.025	200	200	0.0125
7	0.0125	200	200	0.00625
8	0.00625	200	200	0.003125
9	0.003125	200	200	0.00156

备注：下述实验中每个标准管需 100 μL 标准溶液（注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度）。

- 4、吸取 100 μL 标准溶液（蒸馏水作空白）加入 100 μL 试剂二，充分混匀，反应 10min，测定 593nm 下的吸光度，计算 ΔA 标准=A 标准-A 空白，此时 Fe^{2+} 终浓度为 0.075、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156、0.00078 $\mu\text{mol/mL}$ ，标准曲线只需做 1-2 次。
- 5、混合液使用前置于常温平衡 10min。
- 6、操作表（在 96 孔板或者 EP 管中进行下述实验）

试剂名称	空白管	测定管
混合液 (μL)	180	180
样本 (μL)	-	6
蒸馏水 (μL)	24	18

充分混匀，常温准确反应 10min，吸取 200 μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板，测定 593nm 吸光值。计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白，空白管只需测 1-2 次。

三、总抗氧化能力计算公式

- 1、标准曲线绘制



根据 Fe^{2+} 终浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y , ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定 (y , ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$)。

2、计算公式:

单位定义: 样本的抗氧化能力以达到同样吸光度变化值 (ΔA) 所需的标准液离子浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 表示。

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = 34 \times x \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 34 \times x \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量} = 34 \times x \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol/mL}) = x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 34 \times x$$

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.204mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.006mL; W : 样本质量, g; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10^4 为单位, 以万计。

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样本, 否则对本试剂盒的检测 results 产生干扰。
3. 样本中不宜添加 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。
4. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 取 0.1g 三叶草叶片加入 1mL 预冷的提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.490 - 0.139 = 0.351$, 带入标曲 $y = 14.039x - 0.0029$, 得出 $x = 0.025$, 按样本质量计算得: 总抗氧化能力 ($\mu\text{mol/g 质量}$) $= 34 \times x \div W = 34 \times 0.025 \div 0.1 = 8.5 \mu\text{mol/g 质量}$ 。

相关发表文献:

- [1] Yu Y, Hu L, Tian D, Yu Y, Lu L, Zhang J, Huang X, Yan M, Chen L, Wu Z, Shi W, Liu G. Toxicities of polystyrene microplastics (MPs) and hexabromocyclododecane (HBCD), alone or in combination, to the hepatopancreas of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Environ Pollut*. 2023 Jul 15;329:121646. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121646. Epub 2023 Apr 25. PMID: 37105466.
- [2] He F, Shi H, Liu R, Tian G, Qi Y, Wang T. Randomly-shaped nanoplastics induced stronger biotoxicity targeted to earthworm *Eisenia fetida* species: Differential effects and the underlying mechanisms of realistic and commercial polystyrene nanoplastics. *Sci Total Environ*. 2023 Jun 15;877:162854. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162854. Epub 2023 Mar 16. PMID: 36931517.
- [3] Bao Z, Zhu Y, Feng Y, Zhang K, Zhang M, Wang Z, Yu L. Enhancement of lipid accumulation and docosahexaenoic acid synthesis in *Schizochytrium* sp. H016 by exogenous supplementation of sesamol. *Bioresour Technol*. 2022 Feb;345:126527. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126527. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34896539.





[4] Bao Z, Zhu Y, Zhang K, Feng Y, Chen X, Lei M, Yu L. High-value utilization of the waste hydrolysate of *Dioscorea zingiberensis* for docosaheptaenoic acid production in *Schizochytrium* sp. *Bioresour Technol.* 2021 Sep;336:125305. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125305. Epub 2021 May 21. PMID: 34044242.

[5] Du Y, Zhang S, Sun-Waterhouse D, Zhou T, Xu F, Waterhouse GIN, Wu P. Physicochemical, structural and emulsifying properties of RG-I enriched pectin extracted from unfermented or fermented cherry pomace. *Food Chem.* 2023 Mar 30;405(Pt B):134985. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134985. Epub 2022 Nov 17. PMID: 36442238.

参考文献:

[1] Madhubalaji C, Mudaliar S, Chauhan V. et al. Evaluation of drying methods on nutritional constituents and antioxidant activities of *Chlorella vulgaris* cultivated in an outdoor open raceway pond[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33: 383-399.

[2] Quan Huali, Li Wenhui, Liang Xinmei. et al. Effect of pre-defatting heat treatment on active substances and in vitro antioxidant capacity of sesame meal[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 13: 133-139.

相关系列产品:

- BC1320/BC1325 羟自由基清除能力检测试剂盒
- BC1330/BC1335 植物类黄酮含量检测试剂盒
- BC1340/BC1345 植物总酚 (TP) 含量检测试剂盒
- BC1350/BC1355 植物原花青素 (OPC) 含量检测试剂盒

