

## 总抗氧化能力 (ABTS 法)试剂盒

分光光度法 50 管/48 样

**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<sup>+</sup>，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<sup>+</sup>溶液后，所含抗氧化成分能与 ABTS<sup>+</sup>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 30d）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<sup>4</sup> 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, $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$		

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 (%) =  $(A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}} \times 100\%$

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 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

$y$ : 吸光值差值  $\Delta A$

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 ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  鲜重) =  $(\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 0.712 \times (\Delta A + 0.0012) \div W$

**(2) 按样本蛋白浓度计算**

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox/mg prot}$ ) =  $(\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times C_{\text{pr}}) = 0.712 \times (\Delta A + 0.0012) \div C_{\text{pr}}$

**(2) 按细胞计算**

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox}/10^4\text{cell}$ ) =  $(\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)})$

=  $0.712 \times (\Delta A + 0.0012) \div \text{细胞数量 (万个)}$

**(3) 按液体体积计算**

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox/mL}$ ) =  $(\Delta A + 0.0012) \div 1.4042 = 0.712 \times (\Delta A + 0.0012)$

$V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样品体积, 50  $\mu\text{L}$ ;  $W$ : 样品质量, g;  $C_{\text{pr}}$ : 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。