

总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒

(FRAP 法) 微板法: 96T

一、试剂组成和配制

试剂组成	试剂名称	96T	保存条件
试剂一	检测缓冲液	15ml×1 瓶	-20℃保存一年
试剂二	基质液	1.5ml×1 支	-20℃,避光保存一年
试剂三	底物液	1.5ml×1 支	-20℃,避光保存一年
FRAP 工作液配置: 按照试剂一: 试剂二: 试剂三 10:1:1 混匀充分, 避光 37℃孵育, 现用现配, 2 小时内用完。			
试剂四	FeSO ₄ -7H ₂ O 标准品	100mg	-20℃保存一年
随试剂盒附送 96 孔酶标板一			

二、预期用途

用于血清、血浆、组织匀浆、细胞(或细胞上清)、唾液、尿液中总抗氧化能力测定。

三、测定原理

在酸性条件下抗氧化物质可以还原 Fe³⁺-TPTZ 产生蓝色的 Fe²⁺-TPTZ, 在 593nm 处读取吸光度可以计算出样品中的总抗氧化能力。

四、测定意义

机体中存在多种抗氧化的大分子、小分子及酶类等, 这些均可以清除体内产生的各种活性氧, 从而阻止活性氧诱导的氧化应激的产生。一个体系内的各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总体水平即体现了该体系内的总抗氧化能力。因此测定血清浆等体液鸡组织、细胞裂解液中的总抗氧化能力具有非常重要的意义。

五、适用仪器：

各种类型的酶标仪或者可以测定微量样本的分光光度计。

六、样本前处理

1、血清(浆)、唾液、尿液、细胞上清等液体样本：

血液样本采集后需及时分离血清或血浆，避免溶血。唾液、尿液、细胞上清等直接取样进行测定。血浆建议肝素或柠檬酸钠抗凝，不宜采用 EDTA。文献报道，人血清总抗氧化能力为 0.5-2mM，人唾液总抗氧化能力为 0.3-1mM。

2、动(植)物组织样本：

准确称取组织重量，按重量 (g) :体积(ml)=1:4 的比例，加入 4 倍体积的生理盐水或者 PBS，冰水浴条件下机械匀浆，以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物，4℃，12000 转/分，离心 5 分钟，取上清测定。

3、细胞样本

收集不少于 100 万细胞(建议细胞刮处理，不宜使用胰酶和 EDTA 消化)，加入 200 μl 冰冷的 PBS，匀浆或超声以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物，4℃，12000 转/分，离心 5 分钟，取上清测定。

六、操作步骤

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水 (μl)	5		
不同浓度的标准品溶液(ul)		5	
样本 (μl)			5
FRAP 工作液 (μl)	180	180	180
37℃ 孵育 3-5min，波长 593nm (或在 585-605nm 内选)，酶标仪读取各孔 OD 值			

七、不同浓度的标准品溶液配置：

称取 27.8mg 本试剂盒提供的 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，溶解并定容到 1ml，此时浓度即为 100mM。取适量 100mM $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液稀释至 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5mM。通常可以使用蒸馏水或样品配制溶液配制标准品。

注 1：对于血清、血浆、唾液或尿液等液体样品推荐用蒸馏水或 PBS 配制标准品；对于细胞或组织样品，推荐用于细胞或组织匀浆的匀浆介质配制标准品，其它样品参考前述方法。

注 2： FeSO_4 溶液宜新鲜配制使用。100mM FeSO_4 溶液容易氧化产生三价铁盐，使溶液的颜色从最初的淡绿色逐渐转变为浅黄色。如果发现溶液的颜色已经呈现明显的黄色，应该弃用该溶液，并使用试剂盒提供的 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 重新配制新鲜的 FeSO_4 溶液。

八、注意事项

- 1、在酸性条件下呈蓝色或近蓝色的试剂对测定结果会产生干扰，需要尽量避免。
- 2、如样本中含有高浓度的铁盐或亚铁盐，都会干扰测定，由于在酸性条件可以抑制样品中内源性物质的干扰。血清(浆)中铁离子或者亚铁离子的总浓度总是低于 $10\ \mu\text{M}$ ，所以不会干扰到 FRAP 法测定。样本中含有少量的金属离子螯合剂也不会影响到测定。
- 3、样本中不能添加 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。
- 4、样本如不能及时检测，建议 -80°C 冻存，在一个月所测数据没有显著变化。
- 5、本试剂盒仅用于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品及药品。
- 6、试剂二对人体有刺激性，请穿实验服并带手套操作。