

总抗氧化能力（T-AOC)说明书（FRAP 法）试剂盒说明书

（分光法 48 样）

一、产品简介：

FRAP 法常用于血浆、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、或各种抗氧化物溶液的总抗氧化能力的检测。即在酸性环境下，抗氧化物可以还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ，随后在 590nm 测定蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 即可获得样品中的总抗氧化能力。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 4.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 4.5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、恒温水浴锅、低温离心机、可调式移液器、研钵、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，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取 0.1g 样本（若是干样可取 0.02-0.05g），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。

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：水溶性样本可直接检测。若是油性样本，可用 80%乙醇溶解后再取上清检测。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 590nm，蒸馏水调零。
- ② 显色液配置：将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合，使用前 37℃预温，现配现用，注意避光。
- ③ 不同样本抗氧化能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 测定超过 1.8，需对样本用 80%乙醇稀释，稀释倍数 D 代入公式计算。
- ④ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

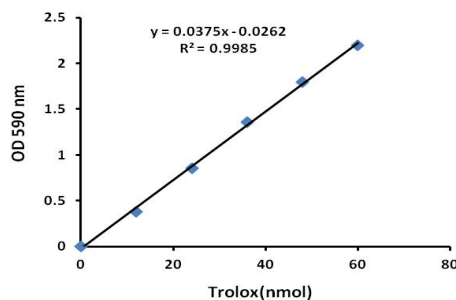
试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（只做一次）
样本	75	0

蒸馏水	75	150
显色液	850	850
混匀后，室温 25℃，准确反应 10min，于 590nm 处读取吸光值 A； $\Delta A = A$ 测定 -A 空白。		

【注】若 ΔA 的值在零附近，可增加样本量 V1（如增至 15 μ L，则蒸馏水相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0375x - 0.0262$ ，x 是标准品 Trolox 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、定义：用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的总抗氧化能力。

3、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0262) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.711 \times (\Delta A + 0.0262) \times D \end{aligned}$$

5、液体样本计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/ mL}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375 \times 10^{-3}] \div V1 \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0262) \times D \end{aligned}$$

V----加入提取液体积，1 mL； V1----反应中样品体积，75 μ L=0.075 mL；

W---样品质量，g； Trolox 分子量----250.29；

D---稀释倍数，未稀释即为 1； 500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

【注意】：

1. 由于本方法是显蓝色测定吸光值，因此尽量避免使用在酸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。
3. 如果样品测定出来的吸光值在标准曲线范围以外，需把样品适当稀释或浓缩后再进行测定。
4. 若样本处理过程中施加了较高浓度的铁盐或亚铁盐会干扰测定，不宜用本测试方法。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（4 μ mol/mL=4nmol/ μ L）：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 4 μ mol/mL 标准品，备用。
- 2 把母液用提取液稀释成以下浓度梯度的标准品：0,0.16,0.32,0.48,0.64,0.8 nmol/ μ L 即 μ mol/mL。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。