

总抗氧化能力（FRAP 法）试剂盒

可见分光光度法 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：

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

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，使用前预冷。

试剂一：液体 50 mL×1 瓶，避光保存。

试剂二：液体 5 mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 5 mL×1 瓶，避光保存。

混合液(现配现用)：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。

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（10⁴ 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 593nm。

2、操作表

	测定管	对照管
样品（μL）		50
提取液（μL）	50	
混合液（μL）	950	950
充分混匀，反应 20min，于 1mL 玻璃比色皿，测定 593nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意：空白管只需测定一次，若测定管吸光值大于 2 则需要用提取液稀释。

总抗氧化能力计算公式：

标准曲线： $y = 2.4832x + 0.0134$ $R^2 = 0.9996$ x: Trolox 浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)

y: 吸光值差值 ΔA

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

(1) 按样本质量计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}$) = $(\Delta A - 0.0134) \div 2.4832 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W)$

= $0.4027 \times (\Delta A - 0.0134) \div W$

(2) 按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol Trolox/mg prot}$) = $(\Delta A - 0.0134) \div 2.4832 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr})$

= $0.4027 \times (\Delta A - 0.0134) \div \text{Cpr}$

(3) 按细胞计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol Trolox}/10^4\text{cell}$) = $(\Delta A - 0.0134) \div 2.4832 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数})$

量 (万个))

= $0.4027 \times (\Delta A - 0.0134) \div \text{细胞数量 (万个)}$

(4) 按液体体积计算

总抗氧化能力 ($\mu\text{mol Trolox/mL}$) = $(\Delta A - 0.0134) \div 2.4832$

= $0.4027 \times (\Delta A - 0.0134)$

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

Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL

注意事项:

1. 尽量避免使用在酸性条件下呈红色或接近红色的试剂，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。
3. 若液体样本为碱性，需要用提取液稀释至酸性后再检测。