

总抗氧化能力（T-AOC）测定试剂盒

说明书修改日期：2015.11.06

Cat number: KGT009

Store at 4℃ for for one year

For Research Use Only

一、测定意义

机体防御体系的抗氧化能力的强弱与健康程度存在着密切联系，该防御体系有酶促与非酶促两个体系，许多酶是以微量元素为活性中心，例如：超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）等，非酶促反应体系中主要为维生素、氨基酸和金属蛋白质。例如：VE、胡萝卜素、VC、半胱氨酸、蛋氨酸、色氨酸、组氨酸、葡萄糖、铜兰蛋白、转铁蛋白、乳铁蛋白等。这个体系的防护氧化作用主要通过三条途径：（1）消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化；（2）分解过氧化物，阻断过氧化链；（3）除去起催化作用的金属离子。防御体系各成分之间相互起到了协同作用，以及代偿作用与依赖作用。

二、测定原理

机体中有许多抗氧化物质，能使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ，后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物，通过比色可测出其抗氧化能力的高低。

三、所需仪器设备

721 或 722 分光光度计、水浴箱。

四、试剂盒组份

组份	KGT009 (25 assays)	保存条件
Buffer A	60.0 mL	4℃
试剂 B	粉剂 1 支	RT
20×Buffer C	3.0 mL	4℃避光
Buffer C 稀释液	30.0 mL	4℃
Buffer D	12.0 mL	RT
Buffer E	12.0 mL	RT

注意事项

1. Buffer B: 试剂 B 用时每支加双蒸水至 120mL, RT 保存。
2. 1×Buffer C: 用前用 Buffer C 稀释液按 1 : 19 稀释至 1×Buffer C (现配现用)。

五、操作

(一)、血清(浆)中总抗氧化能力的测定:(样本前处理见附录(一)中的第一点)

1、操作表:

	对照管	测定管
Buffer A (mL)	1.0	1.0
待测样本 (mL)		a
Buffer B (mL)	2.0	2.0
1×Buffer C (mL)	0.5	0.5
漩涡混匀器充分混匀, 37℃水浴 30 分钟		
Buffer D (mL)	0.1	0.1
待测样本 (mL)	a*	

漩涡混匀器充分混匀, 放置 10 分钟, 蒸馏水调零, 1cm 光径, 520nm 处测各管吸光度。

参考取样量: 血清(血浆)为 0.1ml。

2、血清(浆)中总抗氧化能力的计算与举例:

①、定义: 在 37℃时, 每分钟每毫升血清(浆)使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位。

②、公式:

总抗氧化能力(单位/mL血清) = 所测得OD值 ÷ 0.01 ÷ 30 × 稀释倍数

$$= \frac{\text{测定管OD} - \text{对照管OD}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总体积mL}}{\text{取样量mL}} \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

③、计算举例:

取血清 0.1ml 测总抗氧化能力, 以蒸馏水调零, 测得对照管吸光度为 0.053, 测定管吸光度为 0.131。

则计算结果为:

(1) 计算公式:

$$\text{总抗氧化能力(单位/mL血清)} = \frac{0.131 - 0.053}{0.01} \div 30 \times \frac{3.7}{0.1} \times 1 = 0.078 \times 123.33 = 9.62 \text{单位/mL血清}$$

(二)、组织中总抗氧化能力的测定：(样本前处理见附录(一)中的第2点)：

1. 操作表：

	对照管	测定管
Buffer A (mL)	1.0	1.0
10%组织匀浆 (mL)		a
Buffer B (mL)	2.0	2.0
1×Buffer C (mL)	0.5	0.5
漩涡混匀器充分混匀，37℃水浴 30 分钟		
Buffer D (mL)	0.2	0.2
10%组织匀浆 (mL)	a*	
Buffer E	0.2	0.2

漩涡混匀器充分混匀，放置 10 分钟，蒸馏水调零，1cm 光径，520nm 处测各管吸光度。

*10%组织匀浆 (mL) 参考取样量：0.1-0.2ml

2、组织匀浆中总抗氧化能力计算与举例：

①、定义：在 37℃时，每分钟每毫克组织蛋白，使反应体系的吸光度 (OD) 值，每增加 0.01 时，为一个总抗氧化能力单位。

②、公式：

总抗氧化能力(单位/毫克蛋白) = 所测得OD值 ÷ 0.01 ÷ 30 × 稀释倍数 ÷ 所测样本蛋白含量

$$= \frac{\text{测定管OD} - \text{对照管OD}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总体积mL}}{\text{取样量mL}} \times \text{样品测试前稀释倍数} \div \text{所测样本蛋白含量}$$

③、计算举例：

10%大鼠肺组织匀浆 0.15ml 测总抗氧化能力。以蒸馏水调零，测得对照管吸光度为 0.050，

测定管吸光度为 0.214，蛋白含量为 10.5mg/ml。则计算结果为：

$$\text{总抗氧化能力(单位/mg蛋白)} = \frac{0.214 - 0.050}{0.01} \div 30 \times \frac{4.05}{0.15} \times 1 \div 10.5 = 0.164 \times 8.571 = 1.41 \text{单位/毫克蛋白}$$

(三)、全血中总抗氧化能力的测定：

1、样本前处理见附录(一)中的第5点。

2、操作步骤:

	对照管	测定管
Buffer A (mL)	1.0	1.0
待测样本 (mL)		a
Buffer B (mL)	2.0	2.0
1×Buffer C (mL)	0.5	0.5
漩涡混匀器充分混匀, 37℃水浴 30 分钟		
Buffer D (mL)	0.1	0.1
待测样本 (mL)	a^*	

漩涡混匀器充分混匀, 放置 10 分钟, 蒸馏水调零, 1cm 光径, 520nm 处测各管吸光度。

参考取样量: 全血一般用双蒸水 1: 9 稀释取 0.05ml。

3、全血中总抗氧化能力的计算与举例:

①、定义: 在 37℃时, 每分钟每毫克组织蛋白, 使反应体系的吸光度 (OD) 值, 每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位。

②、公式:

总抗氧化能力(单位/mL全血) = 所测得OD值 ÷ 0.01 ÷ 30 × 稀释倍数

$$= \frac{\text{测定管OD} - \text{对照管OD}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总体积mL}}{\text{取样量mL}} \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

③、计算举例:

取新鲜小鼠全血 1: 9 用蒸馏水稀释, 取 0.05ml 测总抗氧化能力, 以蒸馏水调零,

测得对照管吸光度为 0.115, 测定管吸光度为 0.213..则计算结果为:

$$\text{总抗氧化能力(单位/mL全血)} = \frac{0.213 - 0.115}{0.01} \div 30 \times \frac{3.65}{0.05} \times 1 = 238.467 \text{单位/ml全血}$$

六、简单操作表: (如果您的样本很多, 可采用简便操作法)

①、混合试剂的配制: 测试前, 将试剂一、二、三每种试剂所用量乘以样本数 (n) 再乘以 2 (因每只测定管均需做对照管), 然后再加上放宽的 4 只, 即 $n \times 2 + 4$, 混合试剂的具体配制见下表:

试剂名称	试剂一	试剂二	试剂三
试剂用量 (ml)	$(n \times 2 + 4) \times 1$	$(n \times 2 + 4) \times 2$	$(n \times 2 + 4) \times 0.5$

将上面所有试剂按顺序加在一起混匀制成混合试剂。混合试剂需现用现配。

②、血清（浆）、全血简便操作表：

	对照管	测定管
待测样本（mL）		a
混合试剂（mL）	3.5	3.5
漩涡混匀器充分混匀，37℃水浴 30 分钟		
Buffer D（mL）	0.1	0.1
待测样本（mL）	a^*	

漩涡混匀器充分混匀，放置 10 分钟，蒸馏水调零，1cm 光径，520nm 处测各管吸光度。

③组织样本简便操作表：

	对照管	测定管
10%组织匀浆（ml）		a
混合试剂（ml）	3.5	3.5
漩涡混匀器充分混匀，37℃水浴 30 分钟		
Buffer D（mL）	0.2	0.2
10%组织匀浆（ml）	a^*	
Buffer E	0.2	0.2

漩涡混匀器充分混匀，放置 10 分钟，蒸馏水调零，1cm 光径，520nm 处测各管吸光度。

七、注意点

1. 样品保存时间：4℃~8℃保存 5~7 天；如果暂时不测，超过 5 天以上可将样本放在-20℃以下保存，温度越低保存时间越长。
2. 垂直加样及加试剂，不要加到管壁上。
3. 可以现加样品后加 1 号试剂，但混匀要充分。
4. 若为微量样品，如耳膜组织、牙髓等进行测试时，试管一定要用肥皂水煮开刷洗干净。
5. 做总抗氧化能力、总氨基酸、维生素 C、维生素 E 等的试管应与其他品种例如 SOD、GSH-PX、ATPase 等测试的试管分开，否则会影响酶类的活力。
6. 测定总抗氧化能力、总氨基酸、维生素 C、维生素 E 等的试管清洗时注意：要用热水加洗涤剂煮开后，

剩热清洗并用自来水冲十余次，单蒸水冲一遍，烤干或晾干。否则会影响其他酶类的测试结果。

7. 在检测过程中，37℃水浴 30 分钟后，在管子中会出现沉淀，加完 Buffer D 后这个沉淀会消失，并且不会影响检测结果。
8. 在混匀时，最好用漩涡混匀器，使液体上下充分混匀（一定要使最下面液体也能旋转到上面）。
9. Buffer D 难吸难打，注意：在吸收 Buffer D 及加 Buffer D 时要慢吸慢打。
10. 本试剂盒仅用于科研。

T-AOC 测定附录（一）

样本前处理

1、血浆样本前处理：

血浆在测试前 3500 转/分离心 10 分钟，取上清待测，否则有些抗凝剂会引起沉淀及混浊，肝素抗凝的血浆不要离心，血清不需要离心。

2、组织样本的前处理：

组织匀浆的制备：

准确称取组织重量，按重量体积比加 9 倍生理盐水制成 10%的匀浆，1000~5000 转/分离心 10 分钟，取上清待测。同时用双缩脲试剂测定 10%组织匀浆蛋白。

3、培养细胞的前处理：

培养细胞悬液的制备：

将培养细胞消化，离心，弃上清，留下层细胞，用生理盐水或匀浆介质制备成 $10^7/cm^3$ 的悬液，即 $10^7/ml$ 的悬液，再进行破碎。破碎细胞的方法有三种：①、用匀浆器匀浆。（可以用匀浆机，也可以用玻璃匀浆器手工匀浆。）②、用进口的超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次。（第三种方法有时会影响酶活力。）制备好的细胞悬液不需要离心，在测试加样前要摇匀后取样。同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白。

4、培养细胞的上清及部分体液均可以按照血清样本处理，一般直接加样。

5、全血样本前处理：一般用双蒸水 10 倍稀释，具体稀释倍数及取样量要做预试。