

总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒说明书 (DPPH 法)

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、医学和药理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：

DPPH 为稳定的自由基，溶于甲醇、乙醇等极性溶剂中，在 515nm 处有最大吸收。向 DPPH 溶液中加入抗氧化剂时，会发生脱色反应，因此可用吸光度的变化并以 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，使用前预冷。

试剂一：液体 60mL×1 瓶，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 30 d）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 515nm。
- 2、操作表 (在 EP 管中反应)

	空白管	测定管
提取液 (μL)	50	
样品 (μL)		50
试剂一 (μL)	950	950
充分混匀, 室温避光反应 20min, 于 1mL 玻璃比色皿测定 515nm 吸光值, $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$		

注意: 空白管只需测定一次, 若 $A_{\text{测定}}$ 小于 0.2, 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:

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}} \times 100\%$$

- 2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示:

$$\text{标准曲线: } y = 1.4144x - 0.0081 \quad R^2 = 0.9977 \quad x: \text{Trolox 浓度} (\mu\text{mol/mL})$$

$$y: \text{吸光值差值 } \Delta A$$

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 DPPH 自由基清除能力。

- (1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0081) \div 1.4144 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 0.707 \times (\Delta A + 0.0081) \div W \end{aligned}$$

- (2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0081) \div 1.4144 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) \\ &= 0.707 \times (\Delta A + 0.0081) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

- (3) 按细胞计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A + 0.0081) \div 1.4144 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \\ &= 0.707 \times (\Delta A + 0.0081) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

- (3) 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力} (\mu\text{mol Trolox/mL}) &= (\Delta A + 0.0081) \div 1.4144 \\ &= 0.707 \times (\Delta A + 0.0081) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 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。