

## 总抗氧化能力（FRAP 法）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**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、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 120mL×1 瓶，使用前预冷。

试剂一：液体 20 mL×1 瓶，避光保存。

试剂二：液体 2 mL×1 瓶，4°C 避光保存。

试剂三：液体 2 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°C 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°C，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°C 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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

(3) 细胞样品

按照细胞数量（ $10^4$  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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 操作步骤：

1、酶标仪预热 30min，调节波长至 593nm。

2、操作表

	空白管	测定管
样品（ $\mu$ L）		10
提取液（ $\mu$ L）	10	
混合液（ $\mu$ L）	190	190

充分混匀，反应 20min，于 96 孔板，测定 593nm 吸光值， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$

**注 意：**空白管只需测定一次，若测定管吸光值大于 1.5 则需要用提取液稀释。

**总抗氧化能力计算公式：**

$$\text{标准曲线: } y = 1.2416x + 0.0134 \quad R^2 = 0.9996 \quad \begin{array}{l} x:\text{Trolox 浓度}(\mu\text{mol/mL}) \\ y:\text{吸光值差值}\Delta A \end{array}$$

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

$$\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0134) \div 1.2416 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 0.8054 \times (\Delta A - 0.0134) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mg prot}) = (\Delta A - 0.0134) \div 1.2416 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr}) = 0.8054 \times (\Delta A - 0.0134) \div \text{Cpr}$$

(3) 按细胞计算

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0134) \div 1.2416 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量(万个)}) \\ &= 0.8054 \times (\Delta A - 0.0134) \div \text{细胞数量(万个)} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/mL}) = (\Delta A - 0.0134) \div 1.2416 = 0.8054 \times (\Delta A - 0.0134)$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 样: 反应中样品体积, 10 $\mu$ L; W: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL

**注意事项：**

1. 试剂二对人体有刺激性，请采取适当的防护措施。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 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。

