

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(FRAP 微板法)

产品简介:

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)主要包括羟基自由基、超氧自由基和过氧化氢。在细胞或组织的正常生理代谢过程中会产生活性氧,同时一些环境因子例如紫外照射、环境污染等也可以诱导活性氧的产生。活性氧产生后,可以导致细胞内脂、蛋白和DNA等的氧化损伤,诱发氧化应激(Oxidative stress),继而导致各种肿瘤、动脉粥样硬化、风湿性关节炎、糖尿病、肝损伤、以及中枢神经系统疾病等。

机体中存在多种抗氧化物,包括抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶等,可以清除体内产生的各种活性氧,以阻止活性氧诱导的氧化应激(oxidative stress)的产生。一个体系内的各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总的水平即体现了该体系内的总抗氧化能力。因此测定血浆、血清、尿液、唾液等各种体液,细胞或组织等裂解液中的总抗氧化能力具有非常重要的生物学意义。

Yuan ye总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(FRAP微板法),即Total Antioxidant Capacity Assay Kit with FRAP method,简称T-AOC Assay Kit,是一种采用铁离子还原能力(Ferric Reducing Ability of Plasma,FRAP)来测定样品抗氧化活性的方法,其原理是在酸性条件下,样品中的抗氧化物质还原 Fe^{3+} -TPTZ产生 Fe^{2+} -TPTZ,呈现出明显的蓝色(紫色),于593nm处有最大的光吸收。在 Fe^{3+} -TPTZ过量的情况下,测定蓝色物质的生成量即可获得待测样品的还原能力,即总抗氧化能力。由于反应在酸性条件下进行,可以抑制内源性的一些干扰因素,并且由于血浆等样品中的铁离子或亚铁离子的总浓度通常低于 $10\mu\text{M}$,因此血浆等样品中的铁离子或亚铁离子不会显著干扰FRAP法的检测反应。本方法可以对血浆、血清、尿液等各种体液,细胞或组织裂解液、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进行检测。该试剂盒仅用于科研领域,不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	R24147 100T	Storage
试剂(A): 亚铁标准溶液(10mM)	1ml	4°C
试剂(B): FRAP Assay buffer	30ml	4°C
试剂(C): TPTZ 溶液	3ml	4°C 避光
试剂(D): 氯化铁溶液	3ml	4°C
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水

- 2、实验材料：植物组织(苹果、香蕉、梨、玉米等)、血液、组织样本等
- 3、研钵或匀浆器、水浴锅
- 4、离心机、离心管
- 5、酶标仪、96 孔板
- 6、水浴锅或恒温箱

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①植物样品：取正常或特殊条件下的新鲜植物组织，洗净，擦干，切碎，迅速称取，按 0.5g 样品：4.5ml 蒸馏水的比例匀浆或研磨，12000g 离心 10min，上清液定容至 5ml 备用。(亦可参考相关资料提取方法提取)

②血浆、血清和尿液样品：取样后可直接用本试剂盒进行测定。

③组织样品：精确称取 50mg 组织，加入 200ul 预冷的 PBS，超声或匀浆处理，充分破碎细胞使其抗氧化物释放出来，4℃ 12000r/min 离心 5min，取上清备用。

④细胞样品：收集约 100 万个细胞(无需准确计数，直接刮下，不用消化处理)，加入 200ul 预冷的 PBS，超声或匀浆处理，充分破碎细胞使其抗氧化物释放出来，4℃ 12000r/min 离心 5min，取上清备用。

⑤抗氧化物质：用水配制成 0.1~1.5mM，即可用于测定。

⑥组织或细胞样品需测定蛋白浓度。样品抗氧化能力较高，可用蒸馏水稀释后再次测定。

2、FRAP 工作液制备：按 FRAP Assay buffer: TPTZ 溶液：氯化铁溶液=10:1:1 的比例配制，一般一个检测各试剂的用量分别为 220ul、22ul、22ul。该工作液宜 2 小时内用完。

3、Fe²⁺标准梯度的制备：用蒸馏水将亚铁标准溶液(10mM)稀释至 0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.2、1.5mM。Fe²⁺标准梯度宜新鲜配置，一周内使用。

4、加样：按照下表设置空白孔、标准孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入 96 孔板中，并注意避免产生气泡，小心混匀。然后，置各管于 37℃水浴锅保温 30min。如果样品的吸光度值过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(ul)	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水	30	—	—
系列 Fe ²⁺ 标准(1~8 号)	—	30	—
样品提取液	—	—	30
FRAP 工作液	264	264	264

5、测定：用酶标仪检测 593nm 处吸光度值，依次记为 A_{空白}、A_{标准}、A_{测定}。

计算:

以系列 Fe^{2+} 标准(1~8 号), 即亚铁离子浓度(mM)为横坐标, 相应吸光度为纵坐标, 作出标准曲线。本方法是以 Fe^{2+} 浓度来表示总抗氧化能力, 因此, 可根据提取液的吸光度在标准曲线上查出相应的 Fe^{2+} 浓度, 即可知道该样品的抗氧化能力。计算方法举例如下,

植物样品的吸光度值和 0.5mM 的 Fe^{2+} 的吸光度值相同, 则该血浆(血清)样品的总抗氧化能力为 $0.5\text{mM}/(0.5\text{g}/5\text{ml})=0.5\text{mmol}/100\text{g}$;

血浆(血清)样品的吸光度值和 0.7mM 的 Fe^{2+} 的吸光度值相同, 则该血浆(血清)样品的总抗氧化能力为 0.7mM;

细胞(组织)匀浆样品的吸光度值和 0.3mM 的 Fe^{2+} 的吸光度值相同, 该匀浆液蛋白浓度为 0.2mg/ml, 则该细胞(组织)样品的总抗氧化能力为 $0.3\text{mM}/0.2\text{mg}/\text{ml}=0.15\text{mmol}/\text{g}$;

0.3mM 的抗氧化物质, 其吸光度值和 0.6mM 的 Fe^{2+} 的吸光度值相同, 则其相对总抗氧化能力为 $0.6\text{mM}/0.3\text{mM}=2$ 。

注意事项:

- 1、 实验材料应尽量新鲜, 样品提取的整个过程最好在 4°C 条件下进行。如取材后不能立即检测, 也可以 -80°C 冻存后再进行测定(应在 1 个月内测定完毕)。
- 2、 亚铁标准溶液如变为黄色或棕黄色应弃用。
- 3、 测定 593nm 如有困难, 亦可在 585~605nm 范围内进行测定。
- 4、 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 6 个月有效。 4°C 运输, 4°C 保存。

附录 1：标准曲线制作：Yuan ye 在室温条件下按说明书操作，对系列标准进行吸光度的测定，其数值及标准曲线如下(仅供参考)：

Fe ²⁺ 浓度(mM)	0	0.05	0.1	0.3	0.5
吸光度	0.078	0.171	0.268	0.626	0.977
Fe ²⁺ 浓度(mM)	0.7	0.9	1.2	1.5	1.8
吸光度	1.359	1.719	2.3	2.639	2.897

总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(FRAP微板法)

