

组织细胞总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法) E2016

描述: 组织细胞总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法), 即 Total Antioxidant Capacity Assay Kit with ABTS Method 是一种灵敏简单的检测总抗氧化能力 (Total Antioxidant Capacity, TAOC) 的试剂盒。

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 主要包括羟基自由基、过氧化氢和超氧自由基。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、 γ 射线照射、化学损伤、细菌病毒感染也可以诱导活性氧的产生。尤其是以中性粒细胞、巨噬细胞为代表的免疫细胞, 在各种诱导条件活化后, 产生大量活性氧。活性氧除杀伤病原体外, 还会导致细胞脂质、蛋白和 DNA 的损伤, 诱发氧化应激 (Oxidative stress), 继而导致各种原发性疾病的发生和加重各种继发性疾病导致的机体损伤。机体中存在多种抗氧化物, 包括抗氧化大分子、酶和抗氧化小分子等, 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体现了该体系内的 TAOC。

原理: ABTS 法测定 TAOC 的原理是利用适当的氧化剂将 ABTS 氧化成蓝绿色的 ABTS⁺, 在样品中抗氧化剂存在时, 蓝绿色的 ABTS⁺ 会被还原为无色的 ABTS, 通过 734nm 测定 ABTS⁺ 的吸光度即可检测样品的 TAOC。利用具有强抗氧化能力的 Trolox 为标准品, 可以计算样品以 Trolox 为参照的 TAOC。

本试剂盒方便快捷, 加入待测样品 5 分钟即可进行吸光度测定。

组成: (1) ABTS 溶液 0.5 ml/瓶 (2) 氧化剂溶液 0.5ml/管
(3) 10mM Trolox 标准品溶液 (10 mM) 0.5ml /管 (4) 组织细胞裂解液 100ml

储存条件: -20℃ 储存, 一年有效

所需设备: 酶标仪 最佳波长 734nm

适用范围: 测定各类动物培养细胞、组织等

操作步骤:

1. 样品的准备

- 1.1 细胞样品的准备: 收集新鲜细胞(如果是贴壁细胞, 请用细胞刮刮下, 不宜使用胰酶和 EDTA 消化), PBS 洗涤细胞一次, 离心收集细胞, 吸尽上清。加入 200 μ l 预冷的组织细胞裂解液, 超声破碎细胞释放其中的抗氧化物。4℃, 10000g 离心 10 分钟。取上清用于总抗氧化能力的测定。不立即测定的样品可以-70℃ 保存。如果样品中总抗氧化能力超出测定范围, 可利用组织细胞裂解液适当稀释后测定, 稀释倍数请通过预实验确定。
- 1.2 组织样品的准备: 取 20mg 组织, 加入 400 μ l 的预冷的组织细胞裂解液, 用匀浆器冰浴匀浆。4℃, 10000g 离心 10 分钟。取上清用于总抗氧化能力的测定。不立即测定的样品可以-70℃ 保存。如果样品中总抗氧化能力超出测定范围, 可利用组织细胞裂解液适当稀释后测定, 稀释倍数请通过预实验确定。

2. 试剂盒的准备

总抗氧化能力检测工作液的配制: 按下表所示比例混合 ABTS 溶液和氧化剂溶液, 室温避光放置 6 小时; 然后利用 PBS 稀释 30-50 倍, 测定 A_{734nm}, 根据吸光度值调整稀释倍数, 至吸光度 A_{734nm} 为 0.7 \pm 0.05, 即为总抗氧化能力检测工作液。

	10 个样品	100 个样品
--	--------	---------

ABTS 溶液	25 μ l	250 μ l
氧化剂溶液	25 μ l	250 μ l

3. 标准品的准备

利用 PBS 将 10mM 的 Trolox 溶液稀释成 1、0.5、0.25、0.125、0.062、0.031 mM 浓度的 Trolox 溶液，用于标准曲线测定。每次测定新鲜配制系列标准品稀释液。

4. 样本测定:

4.1 参考下表，使用 96 孔板，依次加入总抗氧化能力检测工作液、样品或标准品后，混匀，室温孵育 5 分钟。

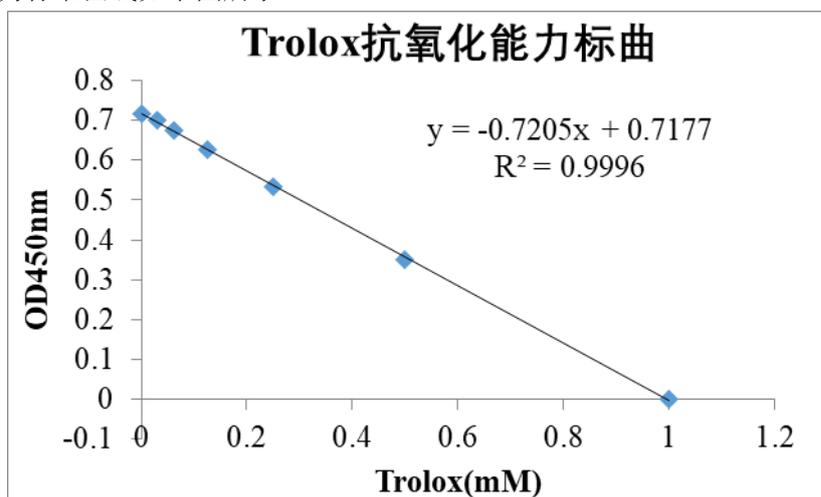
	空白对照	标准曲线	样品
总抗氧化能力检测工作液	200 μ l	200 μ l	200 μ l
标准品	—	10 μ l	—
样品	—	—	10 μ l
PBS	10 μ l	—	—
室温孵育	5 min	5 min	5 min

4.2 孵育结束后，利用酶标仪测定 A_{734nm} 。如果样品吸光度过低，可适当稀释样品后测定，如果样品吸光度无明显下降，可适当冷冻干燥浓缩样品后测定。

5. 数据处理

利用标准品浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标制作 Trolox 抗氧化能力标准曲线，并获得横纵坐标之间的函数关系式，然后利用各样品的吸光度值计算样品的总抗氧化能力。对于细胞和组织样品，可以根据样品中蛋白浓度测定，计算每毫克蛋白中总抗氧化能力。

Trolox 抗氧化能力标准曲线如下图所示：



参考文献:

- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1999. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys, 280(1): 1-8.
- Re, R., Pellegrini, N., Proggente, A., et al., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, 1998. Free Radical Biology & Medicine, 26(9/10): 1231-137.

注意事项:

- 本试剂盒检测涉及氧化还原反应，很多氧化剂和还原剂都会干扰试剂盒的测定，特别是巯基乙醇、DTT

等含有巯基的试剂会严重干扰本试剂盒的测定, 请尽量避免。

2. 每次测定同时利用标准品制作标准曲线。
3. 初次使用试剂盒时, 粉末试剂和小体积液体试剂请适当离心后使用。
4. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。