

# ABTS 自由基清除能力试剂盒说明书

(微板法 96 样)

## 一、产品简介:

ABTS 是一种介体物质,用  $K_2S_2O_8$  与 ABTS 直接生成稳定的阳离子自由基  $ABTS^+$ , 抗氧化物质与  $ABTS^+$  发生反应而使反应体系褪色。

$ABTS^+$  自由基离子的最大吸收波长为 734nm, 所以, 用 734 nm 可以检测  $ABTS^+$  自由基离子的浓度。如果 734nm 减小, 表明  $ABTS^+$  自由基离子被清除, 进而对样本中 ABTS 清除能力进行定量分析。

## 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格        | 保存要求   | 备注   |
|------|-----------|--------|--|
| 试剂一  | 粉剂 mg×2 支 | 4°C 保存 | 用前甩几下使粉剂落入底部, 每支加 0.49mL 蒸馏水溶解 (溶解后一周内用完)。 |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 支 | 4°C 保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 2.86mL 蒸馏水, 充分溶解备用。      |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支 | 4°C 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。                            |

工作液配置: 临用前将加水溶解后的试剂一和试剂二按照 1:1 比例混合, 避光反应 12h 后 (二天内用完), 再用无水乙醇稀释 20-30 倍备用 (使 A 空白管在  $0.7 \pm 0.1$ , 用乙醇稀释后的液体即工作液最好现配现用)。

## 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、甲醇、无水乙醇和蒸馏水。

## 四、ABTS 自由基清除能力测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

### 1、样本制备:

#### ① 组织样本:

称取约 0.1g 新鲜组织或者称取约 0.05g 烘干样本 (将样本在 105°C 下杀青 3min, 然后 60°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 得到烘干样本), 加入 1mL 的 80% 甲醇提取液 (若鲜样需研磨均质), 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次), 若有损失需用 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

#### ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 的 80% 甲醇提取液进行匀浆; 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次), 若有损失需用 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm, 离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液 (mL) 为 1000~5000: 1 比例进行提取。

#### ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

### 2、上机检测:

#### ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 734nm。

② 不同样本清除能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 若 A 测定-A 对照接近零, 需对样本进行稀释 (用 80% 甲醇提取液稀释) 后再检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。

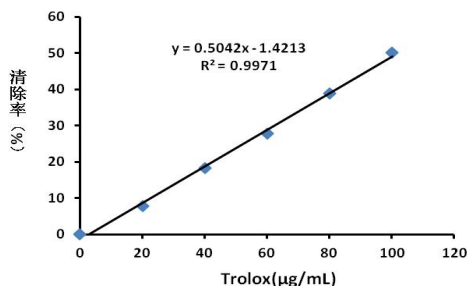
#### ③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL)                                  | 测定管 | 对照管 | 空白管 (仅做一次) |
|--|-----|-----|------------|
| 样本   | 10  | 10  |            |
| 无水乙醇                                       |     | 190 | 10         |
| 工作液  | 190 |     | 190        |
| 混匀, 室温 (25°C) 避光静置 6min, 于 734nm 处读取吸光值 A。 |     |     |            |

【注】若一次性样本较多, 可用排枪或者分批检测, 以使测定管的反应时间 (避光静置 6min) 保持一致。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.5042x - 1.4213$ ,  $x$  是标准品 Trolox 质量 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $y$  是清除率 (%)。



2、ABTS 自由基清除率 (%) =  $[(1 - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div A_{\text{空白}}) \times 100]\%$

3、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 ABTS 自由基清除能力。

4、按样本质量计算:

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(清除率 + 1.4213) \div 0.5042 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ = 1.983 \times (清除率 + 1.4213) \div W \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 + 1.4213) \div 0.5042 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D$$

5、按细菌或细胞数量计算:

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = [(清除率 + 1.4213) \div 0.5042 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ = 1.983 \times (清除率 + 1.4213) \div 500 \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = [(70 + 1.4213) \div 0.5042 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

6、液体样本:

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = [(清除率 + 1.4213) \div 0.5042] \times D \\ = 1.983 \times (清除率 + 1.4213) \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = [(70 + 1.4213) \div 0.5042] \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积,  $10\mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$ ;

W---样品质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

Trolox 分子量---250.29;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 ( $1\text{mg/mL}$ ): 称取  $2\text{mg}$  标准品即 Trolox 至一新 EP 管, 再加  $2\text{mL}$  甲醇充分溶解, 即  $1\text{mg/mL}$  标准品, 备用。
- 2 把母液用甲醇稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 20, 40, 60, 80,  $100\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。