

PTIO 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: G0179F 分光法 48 样)

一、产品简介:

PTIO 自由基清除能力检测是一种体外抗氧化活性评价方法, 通过测量样品清除特定自由基的效率, 来量化其抗氧化能力的强弱。

PTIO 自由基在 557nm 处有强吸收峰。当样品中存在抗氧化成分时, 会清除 PTIO 自由基, 导致溶液吸光度 (A557nm) 下降, 下降程度与清除能力成正比。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	4°C保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 每支加 0.5mL 无水乙醇完全溶解。溶解完的可分装避光保存, 避免反复冻融。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

制备工作液: 试剂一: 溶解好的试剂二=19:1 做为工作液使用, 即溶解好的试剂二用试剂一稀释 20 倍, 用多少配制多少工作液, 配制好的工作液一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵、无水乙醇和蒸馏水。

四、PTIO 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 的提取液研磨匀浆; 12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若样本油脂含量较高 (如花生, 肝脏) 则将在提取步骤中将提取液换成 80% 乙醇。

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 的提取液进行匀浆; 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 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 557nm, 蒸馏水调零。

② 不同样本清除能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。

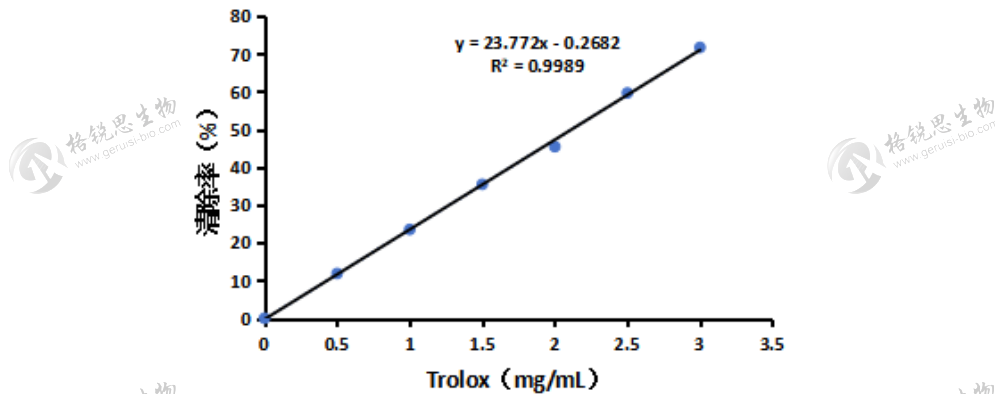
③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	200	200	
提取液	250	570	450
试剂一	320		320

混匀, 37°C 避光静置 30min, 转移全部液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 557nm 处读取吸光值 A。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 23.772x - 0.2682$ ，x 是标准品 Trolox 的浓度 (mg/mL)，y 是清除率 (%)。



2、PTIO 自由基清除率(%)=[(1-(A 测定-A 对照)÷A 空白)×100]%, 最好在 (10-90%之间)。

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PTIO自由基清除能力。

4、按样本质量计算：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/g 鲜重)} = \frac{(\text{清除率} + 0.2682) \div 23.772 \times 0.2}{(V1 \div V \times W)} \times D$$

$$= 0.042 \times (\text{清除率} + 0.2682) \div W \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/g 鲜重)} = 0.042 \times (70 + 0.2682) \div W \times D$$

5、按细菌或细胞数量计算：

$$\text{PTIO 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = \frac{(\text{清除率} + 0.2682) \div 23.772 \times 0.2}{(V1 \div V \times 500)} \times D$$

$$= 0.042 \times (\text{清除率} + 0.2682) \div 500 \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox}/10^4 \text{ cell}) = 0.042 \times (70 + 0.2682) \div 500 \times D$$

6、液体样本：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/mL)} = \frac{(\text{清除率} + 0.2682) \div 23.772 \times 0.2}{V1} \times D$$

$$= 0.042 \times (\text{清除率} + 0.2682) \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/mL)} = 0.042 \times (70 + 0.2682) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---反应中样品体积，200μL=0.2mL；

0.2---做标曲时加样体积，mL；

W---样品质量，g； Trolox 分子量---250.29；

500---细菌或细胞总数，万；

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 (3mg/mL)：称取 3mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管，再加 1mL 乙醇充分溶解，即 3mg/mL 标准品，备用。
- 2 把母液用乙醇稀释成以下浓度梯度的标准品：0，1，1.5，2，2.5，3mg/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。