

PTIO 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: G0179W 微板法 96 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 120mL×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=9:1 做为工作液使用,即溶解好的试剂二用试剂一稀释 10 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:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、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 酶标仪调节波长至 557nm。

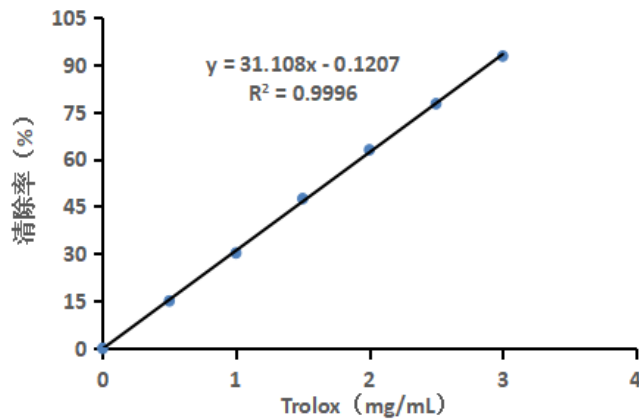
② 不同样本清除能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。

③ 在 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	40	40	
试剂一	80	160	120
工作液	80		80
混匀, 37°C 避光静置 30min, 于 557nm 处读取吸光值 A。			

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 31.108x - 0.1207$ ， 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：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/g 鲜重)} = \frac{(\text{清除率} + 0.1207) \div 31.108 \times 0.04}{(V1 \div V \times W) \times D} \\ = 0.032 \times (\text{清除率} + 0.1207) \div W \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/g 鲜重)} = 0.032 \times (70 + 0.1207) \div W \times D$$

5、按细菌或细胞数量计算：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/10}^4 \text{ cell)} = \frac{(\text{清除率} + 0.1207) \div 31.108 \times 0.04}{(V1 \div V \times 500) \times D} \\ = 0.032 \times (\text{清除率} + 0.1207) \div 500 \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/10}^4 \text{ cell)} = 0.032 \times (70 + 0.1207) \div 500 \times D$$

6、液体样本：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/mL)} = \frac{(\text{清除率} + 0.1207) \div 31.108 \times 0.04}{D} \div V1 \\ = 0.032 \times (\text{清除率} + 0.1207) \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{PTIO 自由基清除能力(mg Trolox/mL)} = 0.032 \times (70 + 0.1207) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---反应中样品体积，40 μ L=0.04 mL；

0.04---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。