

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K225-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(590-600 nm)

Elabscience®总抗氧化能力(T-AOC)比色法测试盒 (FRAP 法)

Total Antioxidant Capacity (T-AOC) Colorimetric Assay Kit (FRAP Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、唾液、尿液、动植物组织、细胞（或细胞上清）中的总抗氧化能力。

检测原理

在酸性条件下抗氧化物质可以还原 Fe^{3+} -TPTZ 产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ, 在 593 nm 处测定吸光度可以计算出样本中的总抗氧化能力。

本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	TPTZ 溶液 (TPTZ Solution)	1 mL×1 支	2 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物液 (Substrate Solution)	1 mL×1 支	2 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准品 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Standard)	100 mg×1 支	200 mg×1 支	2-8°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（590-600 nm）

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M, pH 7.4）。

试剂准备

① 试剂盒中的试剂平衡至室温。

② FRAP工作液的配制：

按试剂一：试剂二：试剂三为10: 1: 1的体积比混匀，现配现用，2小时内用完。

③ 100 mmol/L硫酸亚铁溶液的配制：

用电子天平精确称取试剂四27.8 mg，加双蒸水1 mL溶解混匀即可。该试剂必须现用现配，硫酸亚铁溶液容易氧化产生三价铁盐，使溶液的颜色从最初的淡绿色逐渐转变为浅黄色。如果发现溶液的颜色已经呈现明显的黄色，弃之，重新配制。

④ 不同浓度标准品的稀释（先将100 mmol/L硫酸亚铁用双蒸水稀释至10 mmol/L，再稀释至以下的浓度）：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.8	2.1	2.5
10 mmol/L 标准品(μ L)	0	15	30	45	60	90	105	125
双蒸水(μ L)	500	485	470	455	440	410	395	375

样本准备

① 样本处理

样本要求:样本中不能含有 DTT、2- 巯基乙醇等还原性试剂。

血清血浆等液体样本:可直接测定。

组织或细胞样本:匀浆介质是 PBS (0.01 M, pH 7.4), 匀浆离心后取上清进行测定, 留取部分上清测蛋白。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.049-2.5 mmol/L, 可参考下表进行稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	HepG2 细胞匀浆	不稀释
人唾液	不稀释	5%小鼠肝匀浆	不稀释
人尿液	不稀释	10%绿萝匀浆	不稀释
细胞上清	不稀释		

注: 稀释液为生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4)。

实验关键点

- ① 在酸性条件下呈蓝色或近蓝色的试剂对检测结果会产生干扰, 需要尽量避免。
- ② 硫酸亚铁的标准液必须现用现配。

操作步骤

- ① 标准孔：取 5 μL 8 个不同浓度的标准品，加入到对应的酶标板孔；
测定孔：取 5 μL 待测样本，加入到对应的酶标板孔。
- ② 向步骤①中的各孔加入 180 μL FRAP 工作液。
- ③ 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3-5 min，酶标仪 593 nm，测定 OD 值。

注：试剂加入酶标孔时，应触酶标板底加入；加样要慢，避免产生气泡。
(气泡影响测定结果)。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度硫酸亚铁(μL)	5	--
待测样本(μL)	--	5
FRAP 工作液(μL)	180	180
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3-5 min，酶标仪 593 nm，测定 OD 值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)等液体样本总抗氧化能力计算公式:

$$\text{T-AOC (mmol/L)} = (\Delta A_{593} - b) \div a \times f$$

组织、细胞总抗氧化能力计算公式:

$$\text{T-AOC (mmol/gprot)} = (\Delta A_{593} - b) \div a \times f \div C_{pr}$$

注解:

y: 标准 OD 值-空白 OD 值

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{593} : 样本 OD 值-空白 OD 值

f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

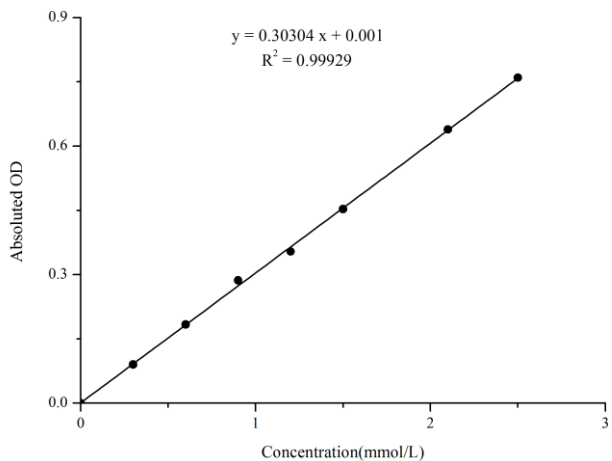
C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度 (gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.049-2.5 mmol/L	平均批间差	8.1 %
灵敏度	0.049 mmol/L	平均批内差	3.9 %
平均回收率	103%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



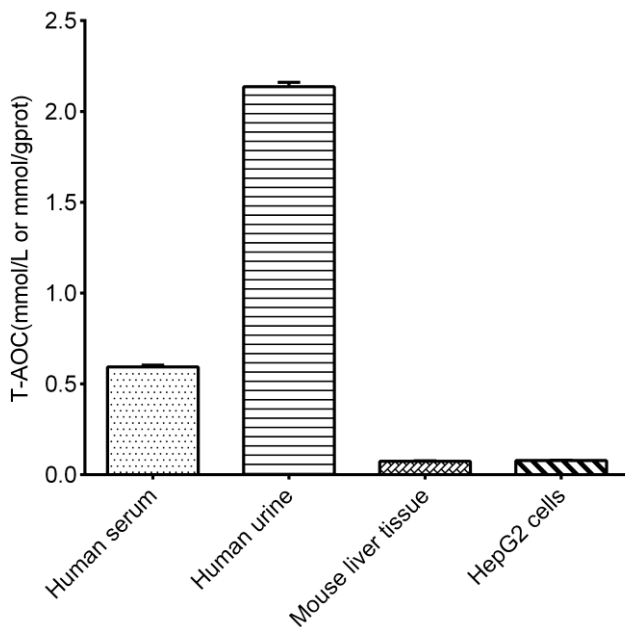
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取5 μL 人血清,按操作操作,结果如下:标准曲线: $y = 0.30304x + 0.001$,空白孔平均OD值为0.0572,测定孔平均OD值为0.2491,计算结果为:

$$\text{T-AOC (mmol/L)} = (0.2491 - 0.0572 - 0.001) \div 0.30304 \times 1 = 0.63 \text{ mmol/L}$$

按照操作过程,测定人血清(加样量5 μL)、人尿液(加样量5 μL)、小鼠肝脏组织(5%组织匀浆的蛋白含量2.30 g/L,加样量5 μL)和HepG2细胞(蛋白含量2.98 g/L,加样量5 μL)中的总抗氧化能力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	微量移液器使用不熟练	小心加样,避免液体溅到其它测样管中
	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
样本测量结果>2.5 mmol/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数,重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675
11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on

- monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
 13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
 14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
 15. Chagas TQ, Freitas N, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
 16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
 17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
 18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
 19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
 20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
 21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell

Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113

22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508

