

铁离子还原能力（ferric reducing ability of plasma）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

抗氧化物可以还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ，随后在 590nm 测定蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 即可获得样品中的铁离子还原能力，吸光值越高表示样品的还原能力越强。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4°C保存	
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、需自备的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、低温离心机、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、铁离子还原能力测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，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 0.1g 样本（若是干样可取 0.02-0.05g），加入 1mL 的 80%乙醇（自备）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）。12000rpm，离心 10min，取上清，置冰上待测。

② 液体样本：水溶性样本可直接检测。若是油性样本，可用 80%乙醇溶解后再取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长至 590nm。

② 显色液配置：将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合，使用前 37°C 预温，现配现用，注意避光。

③ 不同样本抗氧化能力不一，可先选取 2 个样本做检测，若 A 测定超过 1.5，需对样本用 80%乙醇稀释，稀释倍数 D 代入公式计算。

④ 在 96 孔板中依次加入：

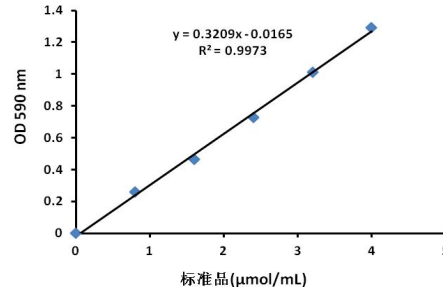
试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（只做一次）
样本	5	0
蒸馏水	25	30
显色液	170	170
混匀后，室温 25°C，准确反应 10min，于 590nm 处读取吸光值 A； $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ；		

【注】1. 若 A 测定值超过 1.5，可对样本用提取液进行稀释，或减少样本上样量 V1（如减至 2 μL ，则提取液增至 28 μL ），则稀释倍数 D 或加样量 V1 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 的值在零附近，可增加样本量 V1（如增至 15 μL ，则蒸馏水相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.3209x - 0.0165$ ， x 是标准品（ FeSO_4 ）摩尔浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， y 是 ΔA 。



2、组织样本：

(1) 按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0165) \div 0.3209 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 3.12 \times (\Delta A + 0.0165) \div W \times D \end{aligned}$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0165) \div 0.3209 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \times D \\ &= 3.12 \times (\Delta A + 0.0165) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、液体样本：

$$\begin{aligned} \text{铁离子还原能力}(\mu\text{mol FeSO}_4/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0165) \div 0.3209 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 3.12 \times (\Delta A + 0.0165) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---反应中样品体积， $5\mu\text{L} = 0.005\text{ mL}$ ；

W---样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白浓度， mg/mL ，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

【注意】：

1. 由于本方法是显蓝色测定吸光值，因此尽量避免使用在酸性条件下呈蓝色或接近蓝色的试剂，否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
2. 样本中不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂和 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的还原剂。
3. 如果样品测定出来的吸光值在标准曲线范围以外，需把样品适当稀释或浓缩后再进行测定。
4. 如果样本中处理过程中施加了较高浓度的铁盐或亚铁盐，会干扰测定，不宜使用本测试方法

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $100\mu\text{mol/mL}$ ）：临用前加 1mL 蒸馏水，充分溶解混匀。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 $\mu\text{mol/mL}$ 。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。