

銅塔克® TAC-Cu®

## 廣域型總抗氧化力檢測套組 (250 assays)

## Total Antioxidant Capacity (TAC) Broad Range Colorimetric Assay Kit

## 快速使用指引

1. 開封前存放條件：4°C 冷藏保存，正確保存狀況下，可存放半年。
2. 吸收光譜儀偵檢波長(nm)：570 nm。
3. 標準液或樣品體積：10 µL。
4. 配置反應溶液呈色劑(A 劑)與硫酸銅溶液(B 劑)體積比例：25:2。
5. 反應溶液添加量：200 µL。
6. 反應呈色溫度與時間：室溫 15 分鐘。
7. TAC 相對於抗壞血酸當量檢測範圍：50~2000 µM。

## 套組介紹

總抗氧化能力(Total Antioxidant Capacity, TAC)可代表體內抗氧化的能力。抗氧化物在防止自由基和其他潛在有毒氧化物質的形成和清除中扮演重要的作用。抗氧化物可分為三類：酵素系統(GSH reductase, catalase, peroxidase 等)、小分子(ascorbic acid, uric acid, vitamin E 等)和蛋白質(albumin, transferrin 等)。不同的抗氧化物的抗氧化能力各有不同。檢測檢體中的 TAC 比單獨測量某一抗氧化物更能反應檢體在生理環境中的抗氧化狀態。而研究顯示，在癌症、糖尿病及心肌梗塞的病人中，TAC 都顯著較正常人低，證明了氧化壓力是造成疾病的重要原因。本套組的測量結果，可直接反應檢體中活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)的影響程度、抵抗氧化損傷和氧化相關疾病的狀態。

經由移除 GSH 與蛋白質訊號干擾，本套組可單獨測量小分子抗氧化物所呈現的抗氧化力，透過小分子抗氧化物將  $\text{Cu}^{2+}$  還原成  $\text{Cu}^+$ 。而還原後的  $\text{Cu}^+$  與呈色劑螯合，在 570 nm 光譜附近產生強烈的吸收光譜變化(OD570)而可對其進行定量檢測。經由比較檢體的與抗壞血酸標準品的 OD570，檢體中的 TAC 值可用抗壞血酸的抗氧化能力當量值(ascorbic acid equivalents)來表示。本套組可使用 96 孔盤，搭配微量孔盤檢測儀(microplate reader)；或是選用 0.5 mL 薄壁離心管，搭配建議之專用光譜儀進行測量，其操作方式請參閱使用步驟。

## 套組內容與試劑準備

1. 呈色劑(A 劑)：50 mL 棕色塑膠瓶\*1，直接使用。
2. 硫酸銅溶液(B 劑)：4 mL 半透明塑膠管\*1，直接使用。
3. 5X Assay buffer(C 劑)：50 mL 白色塑膠瓶\*1，使用前以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋成 1X。
4. 抗壞血酸標準品：1 mL 咖啡色尖底塑膠瓶\*1，加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O 即得 10X 抗壞血酸標準液(100 mM)。標準品回溶後立即使用或是 100 µL 分裝後凍存於-20°C。
5. 蛋白阻斷劑(D 劑)：4 mL 半透明塑膠管\*1。

## 套組運送與保存資訊

組成	運送資訊	包裝開封前保存資訊
1. A 劑：呈色劑	4 °C 冷藏運送	4 °C 冷藏保存。 正確保存狀況下，可存放半年。
2. B 劑：硫酸銅溶液		
3. C 劑：5X 緩衝溶液		

4. 抗壞血酸標準品		
5. 蛋白阻斷劑(D 劑)		

### 套組內未提供(檢測操作所需)

1. 96 孔微量盤(microplate)
2. 10 kDa 蛋白質離心過濾管(用於高蛋白含量的樣品)
3. 二次蒸餾水(Distillation-Distillation H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)
4. 磷酸鹽緩衝液(Phosphate buffered saline, PBS)
5. 10 µL 至 1000 µL 微量分注器 (micropipettes)
6. 錐形離心管·微量離心管和用於製備樣品和緩衝液的容器
7. 離心機和微量離心機
8. 超音波震盪機或組織均質機
9. 微量盤檢測儀(microplate reader)·能夠讀取 540-600 nm 之間的吸光值

### 檢體製備

所有檢體應立即分析或在-80°C 下保存不超過 2 個月。檢體與反應試劑作用後，確認檢測讀值在標準品的線性可信區間內。高濃度的檢體可能會導致檢測結果被檢體中其他成份干擾。在測試之前，可根據需要，以 PBS 稀釋檢體，每次測試時，應使用同批標準液建立檢量線。

**體液**：將組織液在 4°C 環境下以 12,000 rpm 離心 20 分鐘。提取上清液後，樣品應立即測試或在-80°C 下冷凍。

**血液**：收集血液檢體並添加到以肝素(heparin)\*作為抗凝劑的血液收集管中。在 4°C 下以 3,000 rpm 離心 10-15 分鐘。小心吸取上層黃色血漿上清液。樣品應立即測試或在-80°C 下冷凍。注意：應避免產生溶血。\*限用肝素做為抗凝劑，EDTA 會干擾呈色反應。

**細胞萃取液**：在 4°C 環境下將 1~2 x 10<sup>6</sup> 細胞/ mL 在 4 倍體積的 1X Assay Buffer(C 劑五倍稀釋液)中透過超音波震盪機處理，或是進行多次凍融循環。在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，然後除去沉澱物。高濃度的蛋白質可能會干擾測定，可用 10 kDa 蛋白質離心過濾管排除蛋白質干擾。完成樣品製備後立即測量，或將其存儲在-80°C。

**組織萃取液**：在 4°C 環境下將約 10 mg 的組織以 1-2 mL 的 1X Assay Buffer(C 劑五倍稀釋液)進行均質/超音波震盪處理。將均質液在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後收集上清液。高濃度的蛋白質可能會干擾測定，可用 10 kDa 蛋白質離心過濾管排除蛋白質干擾。完成樣品製備後立即測量，或將其存儲在-80°C。

**食物萃取物**：用水沖洗未煮熟的食物(例：水果或蔬菜)，並在 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中將 5 克樣品(新鮮重量)均質打碎 30 秒。將均質液在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後收集上清液。提取上清液後，樣品應立即測試或在-80°C 下冷凍。

### 操作步驟

1. 解凍樣品後，加入樣品一半體積的蛋白阻斷劑溶液，靜置於室溫 15 分鐘後，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後，收集上清液。(例如 10 µL 樣品加入 5 µL 阻斷劑)
2. 解凍 10X 抗壞血酸標準液(100 mM)，以 1X Assay buffer 稀釋 10 倍。

梯度稀釋抗壞血酸標準液(10 mM)以配置標準曲線(standard curve)。配置可參考下表：

編號	濃度 (mM)	來源 (µL)	1X Assay Buffer (µL)	加總 (µL)	最後體積 (µL)
A	2.5	125 取自 1X 標準液	375	500	500
B	2	200 取自 1X 標準液	800	1000	1000
C	1.5	150 取自 1X 標準液	850	1000	800
D	1	90 取自 1X 標準液	810	900	400
E	0.75	200 取自 C 管	200	400	400

F	0.5	500 取自 D 管	500	1000	500
G	0.25	400 取自 F 管	400	800	800
H	0.05	100 取自 F 管	900	1000	1000
I	0 (Blank)	--	500	500	500

3. 配置反應溶液：將呈色劑 (A 劑)與硫酸銅溶液(B 劑)依 25:2 的體積比例混和。  
(例如：配置反應溶液 27 mL = 硫酸銅溶液 2 mL + 呈色液 25 mL)。
4. 在 96 孔盤中加入梯度濃度之標準液或樣品各 10  $\mu$ L
5. 加入 200  $\mu$ L 反應溶液，混合均勻後在室溫下避光靜置 15 分鐘
6. 使用 570 nm 作為主要波長，以微量盤檢測儀上讀取吸光值。確保儀器讀值在測定線性範圍內(0-2.5 OD)，必要時進行樣品稀釋。

### 結果換算

1. 將抗壞血酸標準品的平均吸光值減去背景值(Blank)後繪製標準曲線(圖 2)
2. 將樣品的平均吸光值減去背景值後與標準曲線進行比較，以推算樣品 TAC 的抗壞血酸當量值(ascorbic acid equivalents) (圖 3)

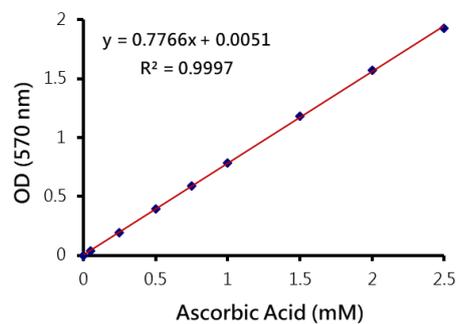


圖 2. 抗壞血酸標準曲線

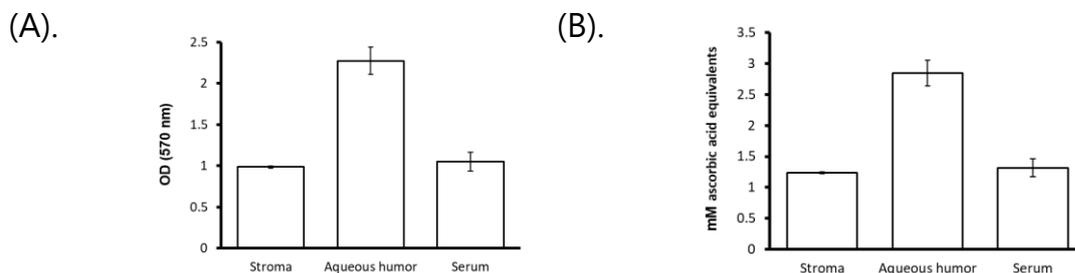


圖 3. TAC 量化換算範例。(A). 同次 TAC 分析的結果可以 OD 570 讀值呈現。(B). 將樣品的 TAC 以抗壞血酸當量值呈現，以便進行不同次試驗之間的比較。

### 引用文獻

1. Tsao, Yu-Ting, et al., *Bioeng Transl Med.* 2020,6(2), e10199.
2. Tsao, Yu-Ting, et al., *Antioxidants* 2022, 11, 397.

## 聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: [polycreatives@outlook.com](mailto:polycreatives@outlook.com)

聯絡人 Contact: Peter Hsu

