

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0892

Size: 100T/96S

总抗氧化能力 (DPPH 法) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药学研究中常常检测血浆、血清、唾液、尿液等各种体液，细胞或组织等裂解液、植物或中草药抽提液及各种抗氧化物(antioxidant)溶液的总抗氧化能力。

二、测定原理:

DPPH·为稳定的自由基，溶于甲醇，乙醇等极性溶剂中，在 515nm 处有最大吸收。向 DPPH·溶液中加入抗氧化剂时，会发生脱色反应，因此可用吸光度的变化并以 Trolox 作为对照体系量化抗氧化物质的抗氧化能力。

三、需自备的仪器和用品:

恒温水浴锅、低温离心机、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶		使用前预冷
试剂一	液体 45mL×1 瓶	避光保存	

五、样品的制备:

1. 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品

血浆（制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝，不宜使用 EDTA 抗凝）4°C，5000rpm 离心 10min，取上清待测。血清、唾液或尿液样品直接用于测定，也可以-80°C冻存（不宜超过 30d）后再测定。

2. 组织样品

按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

3. 细胞样品

按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

六、操作步骤:

(1) 酶标仪预热 30min，调节波长至 515nm。

(2) 操作表（在 EP 管中反应）

	空白管	测定管
提取液 (μL)	20	
样品 (μL)		20
试剂一 (μL)	380	380

充分混匀，室温避光反应 20min，取 200 μL 至 96 孔板测定 515nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$

注意：空白管只需测定一次，若 A 测定小于 0.2，需用提取液稀释后检测。

七、总抗氧化能力计算公式：

1.1、以自由基清除率表示：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}} \times 100\%$$

2.2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：

$$\text{标准曲线: } y = 0.7072x - 0.0081 \quad R^2 = 0.9977$$

x: Trolox 浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)

y: 吸光值差值 ΔA

单位定义: 用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的 DPPH 自由基清除能力。

(1) 按样本质量计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0081) \div 0.7072 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 1.414 \times (\Delta A + 0.0081) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol Trolox/mg prot}) = (\Delta A + 0.0081) \div 0.7072 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times C_{\text{pr}}) = 1.414 \times (\Delta A + 0.0081) \div C_{\text{pr}}$$

(3) 按细胞计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol Trolox}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0081) \div 0.7072 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) = 1.414 \times (\Delta A + 0.0081) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{总抗氧化能力 } (\mu\text{mol Trolox/mL}) = (\Delta A + 0.0081) \div 0.7072 = 1.414 \times (\Delta A + 0.0081)$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 样: 反应中样品体积, 20 μL ; W: 样品质量, g;
Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL

八、注意事项：

- (1) 尽量避免使用在酸性条件下呈红色或接近红色的试剂，否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
- (2) 样品中不宜添加 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) 若液体样本为碱性，需要用提取液稀释至酸性后再检测。