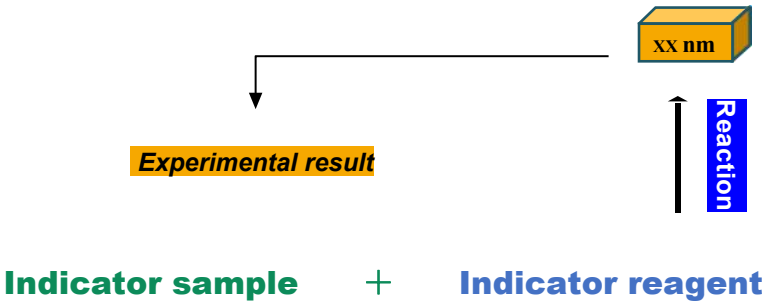
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0892 规格：100管/96样

总抗氧化能力(DPPH 法)试剂盒说明书

DPPH 法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

研究意义：

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。

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。

自备实验用品：

恒温水浴锅、低温离心机、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

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	-

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℃，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℃冻存（不宜超过30 d）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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

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 200μL 至 96 孔板测定 515nm 吸光值，△A= A **空白-A 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。

总抗氧化能力计算公式：

1、以自由基清除率表示：

DPPH 自由基清除率（%）=（A 空白-A 测定）÷A 空白×100%

2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：

标准曲线：y = 0.7072x - 0.0081　　R^2 = 0.9977

x:Trolox 浓度(μmol/mL)　　y:吸光值差值△A

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

总抗氧化能力（μmol Trolox/g 鲜重）=（△A+0.0081）÷0.7072×V 样÷(V 样÷V 样总×W)

=1.414×（△A+0.0081）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算

总抗氧化能力（μmol Trolox/mg prot）=（△A+0.0081）÷0.7072×V 样÷(V 样÷V 样总×Cpr)

=1.414×（△A+0.0081）÷Cpr

(3) 按细胞计算

总抗氧化能力（μmol Trolox/10^4cell）=（△A+0.0081）÷0.7072×V 样÷（V 样÷V 样总×细胞数量（万个））= 1.414×（△A+0.0081）÷ 细胞数量（万个）

（3）按液体体积计算

总抗氧化能力（μmol Trolox/mL）=（△A+0.0081）÷0.7072=1.414×（△A+0.0081）

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

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。