北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

总抗氧化能力(DPPH 法)试剂盒说明书

分光光度法 50T/48S

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、分光光度计、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，使用前预冷。

试剂一：液体 60mL×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 、 分光光度计预热 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)	50	
样 品 (μL)		50
试剂一 (μL)	950	950
充分混匀， 室温避光反应 20min，于 1mL 玻璃比色皿测定 515nm 吸光值， $\triangle A = A_{空白} - A_{测定}$		

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： $y = 1.4144x - 0.0081$ $R^2 = 0.9977$ 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）÷1.4144×V 样÷(V 样÷V 样总×W)

=0.707×（△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）÷1.4144×V 样÷(V 样÷V 样总×Cpr)

=0.707×（△A+0.0081）÷Cpr

(3) 按细胞计算

总抗氧化能力(μmol Trolox/10^4cell）=（△A+0.0081）÷1.4144×V 样÷（V 样÷V 样总×细胞数量(万个)）

= 0.707×（△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）÷1.4144

=0.707×（△A+0.0081）

V 样总：加入提取液体积， 1 mL；V 样： 反应中样品体积，50μL；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。

