

## 总抗氧化能力(DPPH 法)试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**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：**

提取液：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存，使用前预冷。

试剂一：液体 45mL×1 瓶，4℃ 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<sup>4</sup>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（ $\mu\text{L}$ ）	20	
样品（ $\mu\text{L}$ ）		20
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	380	380
充分混匀，室温避光反应 20min，取 200 $\mu\text{L}$ 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。

**总抗氧化能力计算公式：**

**1、以自由基清除率表示：**

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

**2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：**

$$\text{标准曲线: } y = 0.7072x - 0.0081 \quad R^2 = 0.9977 \quad \begin{array}{l} x: \text{Trolox 浓度}(\mu\text{mol/mL}) \\ y: \text{吸光值差值} \Delta A \end{array}$$

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

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

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

(3) 按细胞计算

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

(3) 按液体体积计算

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

V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 样：反应中样品体积，20 $\mu$ L；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。