

## 总抗氧化能力(DPPH 法)试剂盒

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，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 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℃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， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 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（%）=  $(A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}} \times 100\%$

#### 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 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

$y$ : 吸光值差值  $\Delta A$

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 ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  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

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

#### （2）按细胞计算

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

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

$V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{样}}$ : 反应中样品体积，20  $\mu\text{L}$ ； $W$ : 样品质量，g； $\text{Cpr}$ : 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。