DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1.使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2.正式检测前选取 2~3 个预期差异较大的样本进行预检测。

3.本试剂盒仅用于科研。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	110 mL×1	4℃	
试剂一	44 mL×1	4℃避光	棕色瓶保存

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水。

四、样品制备

1. 血清、血浆等液体样品：直接测定。

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min 后，置于冰上，上清液为待测样本。

3. 按照细胞数量（10^4个）：提取液细胞样品

体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；10000 g，4℃离心 10 min 后，置于冰上，上清液为待测样本。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 515 nm 处。

2. 在 1.5 mL 离心管中依次加入（加入下列试剂时确保准确，降低误差）：

试剂名称	空白管	测定管
提取液（μL）	20	-
样本（μL）	-	20
试剂一（μL）	380	380
充分混匀，室温避光反应 20 min，取 200 μL 至 96 孔板测定 515 nm 吸光值，ΔA=A 空白-A 测定。注意：空白管只需测定 2~3 次。		

六、计算：

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%

注意：为了比较不同样本 **DPPH** 自由基清除能力，对于同一批样本必须加入等量的样本 ，血清、组织匀浆、果汁等液体样本加入同样体积，提取物（或者药物 ）配制成同样浓度。

2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：

标准曲线：y = 0.6208x - 0.0028 ， R^2 = 0.9996；

x：标准品 Trolox 浓度（μmol/mL），y：吸光值ΔA

单位定义:以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

DPPH 自由基清除能力（μmol Trolox/g 鲜重）=（ΔA+0.0028）÷0.6208×V 样÷（V 样÷V 样总×W）=1.6108×（ΔA+0.0028）÷W

（2）按样本蛋白浓度计算（需另外测蛋白浓度）

DPPH 自由基清除能力（μmol Trolox/mg prot）=（ΔA+0.0028）÷0.6208×V 样÷（V 样÷V 样总×Cpr）=1.6108×（ΔA+0.0028）÷Cpr

（3）按细胞计算

DPPH 自由基清除能力（μmol Trolox/10^4cell）=（ΔA+0.0028）÷0.6208×V 样÷（V 样÷V 样总×细胞数量（万个））=1.6108×（ΔA+0.0028）÷细胞数量（万个）

（4）按液体体积计算

DPPH 自由基清除能力（μmol Trolox/mL）=（ΔA+0.0028）÷0.6208

=1.6108×（ΔA+0.0028）

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。

七、产品简介

当生物遭遇胁迫时，体内会产生过量活性氧。此时，生物自身的抗氧化系统（包括超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT 等酶系统和维生素 C、谷胱甘肽等非酶物质）会被激活以清除活性氧，保护细胞。通过检测胁迫条件下生物 DPPH 清除能力的变化，可以直观反映其抗氧化防御系统的强弱，从而评估其抗逆能力。