

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K807-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(505-545 nm)

**Elabscience® DPPH 自由基清除能力比色法测试盒**  
DPPH Free Radical Scavenging Capacity  
Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、动植物组织及细胞样本的 DPPH 自由基清除能力。

## 检测原理

DPPH 是一种合成有机自由基，可用来评估抗氧化物的抗氧化活性，其单电子在 525 nm 有最大吸收，测定加入抗氧化物前后的 OD 值变化能够计算样本的 DPPH 自由基清除能力。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
	15 mL 棕色塑料瓶	1 个	
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪(波长 505-545 nm，最佳检测波长 525 nm)、超声振荡器

**试剂：**无水乙醇、80%乙醇

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液的配制：

取一支试剂一，加入1 mL无水乙醇，超声震荡1 min，将得到的溶液全部转移至15 mL棕色塑料瓶中，再向棕色塑料瓶中加入11 mL无水乙醇，超声震荡5 min后使用（若无超声振荡器，溶液全部转移至棕色塑料瓶后于室温避光静置2小时），未使用的溶液2-8℃避光可存放2周。

③ 12.5 mmol/L标准品溶液的配制：

取一支试剂二，加入1 mL无水乙醇，混匀溶解，未使用的溶液2-8℃避光可存放1周。

④ 125 μmol/L标准品溶液的配制：

按12.5 mmol/L标准溶液：无水乙醇=1：99体积比配制，按需配制，现配现用。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (μmol/L)	0	25	50	62.5	75	87.5	100	125
125 μmol/L 标准品 (μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
无水乙醇 (μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量 (g) : 80%乙醇体积 (mL) =1: 9的比例匀浆, 4°C, 10000 ×g离心10 min, 取上清液, 置于冰上待测。

细胞样本：取 $1 \times 10^6$ 个细胞, 加入200 μL 80%乙醇匀浆, 4°C, 10000 ×g离心10 min, 取上清液, 置于冰上待测。

血清 (浆) 样本：直接检测。

### ② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 17.39-125 μmol VC/L, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	3-6	10%牛肝组织	4-8
10%大鼠心脏组织	不稀释	10%小鼠肺组织	3-6
10%小鼠心脏组织	不稀释	10%小鼠胃组织	3-6
马血清	不稀释	狗血清	不稀释
大鼠血清	不稀释	小鼠血清	不稀释
$1.92 \times 10^6$ 个 CHO 细胞	不稀释	$2.164 \times 10^6$ 个 Molt-4 细胞	不稀释

注：稀释液为 80%乙醇。

## 实验关键点

试剂一工作液需超声 5 min 或室温避光静置 2 小时以后使用。

## 操作步骤

### 组织、细胞样本：

- ① 标准孔：取 80  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液，加入相应的酶标孔中。  
测定孔：取 80  $\mu\text{L}$  待测样本加入酶标孔中。  
对照孔：取 80  $\mu\text{L}$  待测样本加入酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和测定孔加入 100  $\mu\text{L}$  试剂一工作液。
- ③ 向步骤①中对照孔加入 100  $\mu\text{L}$  无水乙醇。
- ④ 振荡 5 s，室温避光静置 10 min，酶标仪于 525 nm 测定各孔 OD 值。

### 血清（浆）样本：

- ① 标准管：取 400  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液，分别加入到 2 mL 的 EP 管中。  
测定管：取 400  $\mu\text{L}$  待测样本加入到 2 mL 的 EP 管中。  
对照管：取 400  $\mu\text{L}$  待测样本加入到 2 mL 的 EP 管中。
- ② 向步骤①中标准管和测定管加入 500  $\mu\text{L}$  试剂一工作液。
- ③ 向步骤①中对照管加入 500  $\mu\text{L}$  无水乙醇。
- ④ 混匀，室温避光静置 10 min。
- ⑤ 4 $^{\circ}\text{C}$ ，4000  $\times$  g 离心 5 min，各管分别吸取 180  $\mu\text{L}$  上清液到相应的 96 孔酶标板中，酶标仪于 525 nm 测定各孔 OD 值。

## 操作表

### 组织、细胞样本：

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品溶液( $\mu\text{L}$ )	80	--	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	80	80
试剂一工作液( $\mu\text{L}$ )	100	100	--
无水乙醇	--	--	100
振荡 5 s, 室温避光静置 10 min, 酶标仪于 525 nm 测定各孔 OD 值			

### 血清（浆）样本：

	标准管	测定管	对照管
不同浓度标准品溶液( $\mu\text{L}$ )	400	--	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	400	400
试剂一工作液( $\mu\text{L}$ )	500	500	--
无水乙醇	--	--	500
混匀, 室温避光静置 10 min, $4000 \times g$ 离心 5 min, 各管分别吸取 180 $\mu\text{L}$ 上清液加入到相应的 96 孔酶标板中, 酶标仪于 525 nm 测定各孔 OD 值			

## 结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

样本 DPPH 自由基清除能力计算公式：

$$\text{DPPH 自由基清除能力} = (A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) - b) \div a \times f$$

( $\mu\text{mol VC/L}$ )

样本 DPPH 自由基清除率计算公式：

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

(%)

**注解：**

y: 空白孔 OD 值（标准品浓度为 0 时的 OD 值）- 标准品 OD 值

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$A_{\text{空白}}$ : 空白 OD 值（标准品浓度为 0 时的 OD 值）

$A_{\text{测定}}$ : 样本测定孔的 OD 值

$A_{\text{对照}}$ : 样本对照孔的 OD 值

f: 待测样本加入反应体系前的稀释倍数

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

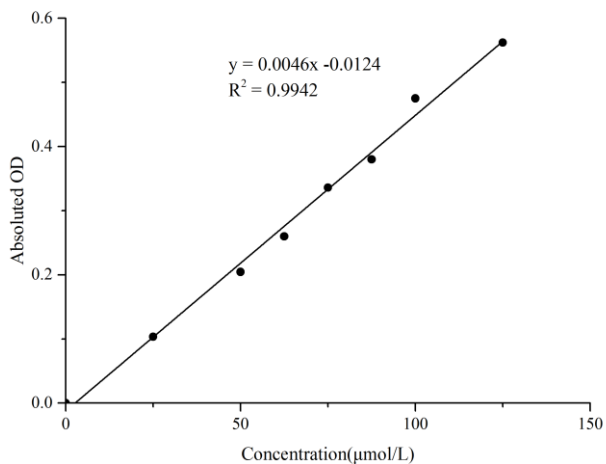
检测范围	17.39-125 $\mu\text{mol VC/L}$	批间差	2.1-9.5 %
检测灵敏度	17.39 $\mu\text{mol VC/L}$	批内差	0.8-3.8 %
加标回收率	96-99 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量80  $\mu\text{L}$ , 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	25	50	62.5	75	87.5	100	125
OD 值	1.602	1.496	1.394	1.353	1.262	1.235	1.115	1.037
	1.608	1.507	1.407	1.337	1.276	1.215	1.145	1.049
平均 OD 值	1.605	1.502	1.401	1.345	1.269	1.225	1.130	1.043
绝对 OD 值	0	0.104	0.205	0.260	0.336	0.380	0.475	0.562

② 绘制标曲(如下图):





## 附录2 实例分析

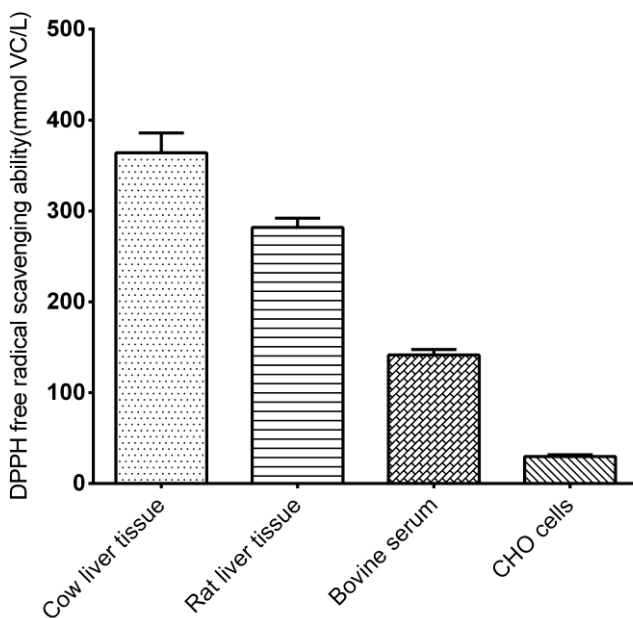
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

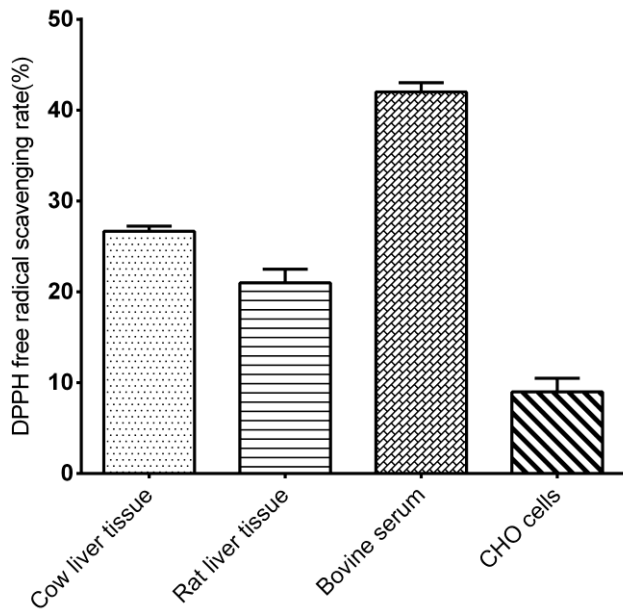
将处理好的10%大鼠肝组织匀浆样本,稀释4倍后取80  $\mu\text{L}$ ,按操作表操作,结果如下:标准曲线:  $y = 0.0046x - 0.0124$ ,空白孔平均OD值为1.605,测定孔平均OD值为1.335,对照孔平均OD值为0.041,计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{DPPH 自由基清除能力} &= (1.605 - (1.335 - 0.041) + 0.0124) \div 0.0046 \times 4 \\ & \quad (\mu\text{mol VC/L}) \\ &= 281.22 \mu\text{mol VC/L} \end{aligned}$$

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1.605 - (1.335 - 0.041)) \div 1.605 \times 100\% = 19\%$$

按说明书操作,测定10%牛肝组织(稀释4倍,加样量80  $\mu\text{L}$ )、10%大鼠肝组织(稀释4倍,加样量80  $\mu\text{L}$ )、牛血清(加样量80  $\mu\text{L}$ )和 $1.92 \times 10^6$ 个CHO细胞(加样量80  $\mu\text{L}$ )的DPPH自由基清除能力和DPPH自由基清除率(如下图):





## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

