（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
网址：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	2-8ºC 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	2-8ºC 避光 保存 6 个月
	15 mL 棕色塑料瓶	1 个	
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	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°C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°C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，4ºC，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测。

细胞样本：取1×10^6个细胞，加入200 μL 80%乙醇匀浆，4 ºC，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
1.92×10^6 个 CHO 细胞	不稀释	2.164×10^6 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 μL 不同浓度的标准品溶液，加入相应的酶标孔中。

测定孔：取 80 μL 待测样本加入酶标孔中。

对照孔：取 80 μL 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 μL 试剂一工作液。

③ 向步骤①中对照孔加入 100 μL 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 μL 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 μL 待测样本加入到 2 mL 的 EP 管中。

对照管：取 400 μL 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 μL 试剂一工作液。

③ 向步骤①中对照管加入 500 μL 无水乙醇。

④ 混匀，室温避光静置 10 min。

⑤ 4°C，4000 × g 离心 5 min，各管分别吸取 180 μL 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(μL)	80	--	--
待测样本(μL)	--	80	80
试剂一工作液(μL)	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(μL)	400	--	--
待测样本(μL)	--	400	400
试剂一工作液(μL)	500	500	--
无水乙醇	--	--	500
混匀，室温避光静置 10 min，4000 × g 离心 5 min，各管分别吸取 180 μL 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：

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

样本 DPPH 自由基清除率计算公式：

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

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

$A_{空白}$：空白 OD 值（标准品浓度为 0 时的 OD 值）

$A_{测定}$：样本测定孔的 OD 值

$A_{对照}$：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

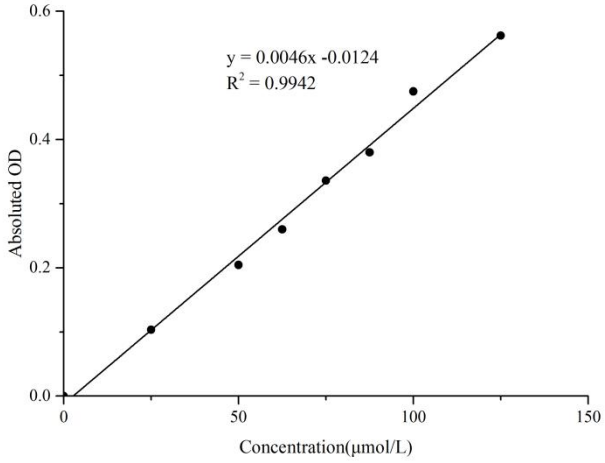
检测范围	17.39-125 μmol VC/L	**批间差**	2.1-9.5 %
检测灵敏度	17.39 μmol VC/L	**批内差**	0.8-3.8 %
加标回收率	96-99 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量80 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/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)：

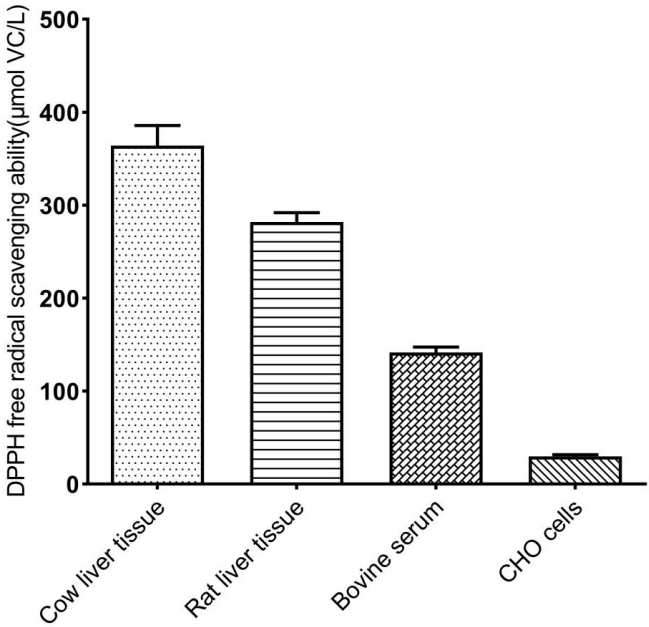
将处理好的10%大鼠肝组织匀浆样本，稀释4倍后取80 μL，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.0046 x - 0.0124，空白孔平均OD值为1.605，测定孔平均OD值为1.335，对照孔平均OD值为0.041，计算结果为：

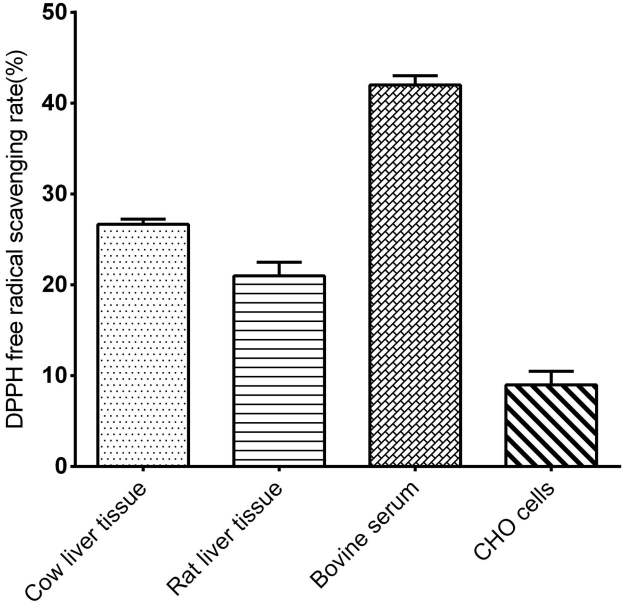
$$\text{DPPH 自由基清除能力 (μmol VC/L)} = (1.605 - (1.335 - 0.041) + 0.0124) \div 0.0046 \times 4$$

$$= 281.22\ \mu\text{mol VC/L}$$

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

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




DPPH free radical scavenging rate(%)
50
40
30
20
10
0
Cow liver tissue
Rat liver tissue
Bovine serum
CHO cells

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。