

EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-DPH400

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

항산화 능력은 사람의 질병과 건강 문제에서 중요한 역할을 합니다. 항산화 능력을 가진 물질을 항산화제라고 합니다. 항산화제는 일반적으로 과일, 야채 등 동·식물 등에 포함되어 있습니다. 항산화제가 풍부한 식품 섭취는 심혈관 질환 및 암을 포함한 다양한 질병의 위험을 감소시킬 수 있습니다.

EZ-DPPH Antioxidant Assay kit 는 안정적인 자유라디칼로 알려진 DPPH 를 사용하여 항산화 능력을 평가하는 방법 중 빠르고 간단한 방법입니다. 보라색을 띄는 DPPH 는 항산화제로부터 환원되어 DPPH•H 를 형성해 옅은 노란색을 나타내며 517 nm 에서 colorimetric 방법으로 측정합니다.

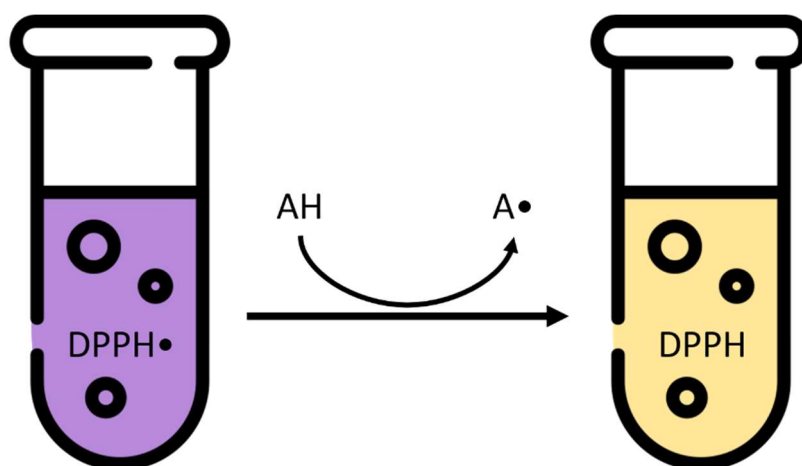


Fig. Reduction of free radical DPPH by antioxidants.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	400 assay	Storage
DPPH Reagent	4 vials	4 °C
DPPH Assay Buffer	20 mL X 2	
Trolox Standard (1 mM)	4 vials	

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* DPPH Assay Buffer 는 사용 전 실온에서 충분히 놓아둔 후 사용하십시오.

* DPPH Reagent 는 사용하기 직전에 준비하고 사용 후 재사용할 수 없습니다.

▪ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
DPPH Reagent	Ethanol 1.1 mL을 넣은 후 강하게 vortexing 하여 완전히 녹입니다. Ethanol 9 mL을 15 mL tube 에 넣은 후 DPPH Reagent 1 mL을 섞어 최종 volume 10 mL이 되도록 준비합니다.	DPPH Reagent 는 ethanol 을 넣은 후 24 시간 안에 사용하십시오. 사용 전에 준비하고, 준비된 용액은 빛으로부터 차단 후 사용하십시오.
Trolox Standard	Ethanol 1 mL 넣어 부드럽게 inverting 하며 잘 섞어줍니다. 사용하기 직전에 준비하여 사용하십시오.	Trolox 에 ethanol 을 넣은 후 24 시간 안에 사용하십시오.

* 본 Kit 사용 시 사용되는 Ethanol(anhydrous), Proteinase K(Merck, P2308 등) 별도 구매하여 사용하십시오.

* 본 protocol 은 96-well plate 를 이용하여 실험/측정하도록 최적화 되어있습니다.

* DPPH Reagent 가 완전히 녹았는지 확인 후 사용하십시오.

▪ General Protocol

Sample preparation

Note

- Sample 추출은 방법과 양이 다를 수 있습니다. 따라서 희석률도 다를 수 있습니다.
 - 부드러운 Sample(ex. 과일류, 야채류 등): 다지거나 분쇄하여 추출 후 사용.
 - 그 외 단단한 Sample(ex. 씨앗, 뿌리, 건조된 식물재료 등): homogenization 혹은 sonication 하여 추출 후 사용.
- 모든 샘플의 농도를 측정하였을 때 O.D 값이 Standard Curve 안에 포함되어야 합니다. 따라서, 샘플을 여러 농도로 준비하여 실험을 진행하십시오.
- 열에 불안정한 sample 은 ICE 위에서 실험을 진행하십시오.
- Sample 에 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 성분이 포함되어 있을 시 측정이 되지 않을 수 있습니다.
- Sample 내 입자가 있거나 색이 있을 경우 정확한 측정이 어렵습니다.

1. Serum

- ① Serum 285 μl 와 Proteinase K (20 mg/mL) 15 μl 를 microtube 넣습니다.
- ② 37 °C에서 45 분 동안 반응시킨 후 다시 90 °C에서 10 분 더 반응시킵니다.
- ③ 4°C, 12,000 x g 에서 60 분 간 centrifuge 후 상층액만 분석에 사용합니다.

2. Fruits, vegetables, other foods and plants

- ① Sample 100 mg에 DPPH Assay Buffer 500 μl 를 넣어 vortexing 을 충분히 한 후 10,000 x g 에서 10 분 간 centrifuge 하고 상층액을 사용합니다.
- ② 보다 정확한 측정을 위해 DPPH Assay Buffer 를 사용하여 여러 농도의 sample 을 준비하십시오.

3. Liquid Sample (Beverages including juices, wines, teas and others)

- ① 0.2 μm 필터를 이용하여 sample 을 여과시켜 바로 사용합니다.
- ② 보다 정확한 측정을 위해 DPPH Assay Buffer 를 사용하여 여러 농도의 sample 을 준비하십시오.

Standard preparation

1mM Trolox Standard Solution 0, 40, 80, 120, 160, 200 μl 를 1.5mL micro tube 에 분주 후 Ethanol 을 첨가하여 Final volume 을 400 μl 로 조정합니다.

Standard No.	1mM Trolox Standard Solution	Ethanol	Final volume	Trolox Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	0 μl	400 μl	400 μl	0
2	40 μl	360 μl	400 μl	25
3	80 μl	320 μl	400 μl	50
4	120 μl	280 μl	400 μl	75
5	160 μl	240 μl	400 μl	100
6	200 μl	200 μl	400 μl	125

* Standard 는 실험 시 마다 측정하는 것이 좋습니다.

DPPH Radical Scavenging Activity Assay

: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)는 Sample 에 대한 EC50*값으로 나타냅니다. (EC50* : DPPH radical 이 50% 소거되는 농도)

	Trolox Standard	Sample	Sample Blank	Blank 1	Blank 2
Trolox Standard Solution	20 μl				
Sample		20 μl	20 μl		
Solvent				20 μl	20 μl
Ethanol			100 μl		100 μl
Assay Buffer	80 μl	80 μl	80 μl	80 μl	80 μl
DPPH Reagent Solution	100 μl	100 μl		100 μl	

* Blank 1 : without antioxidant,

Blank 2 : ethanol blank,

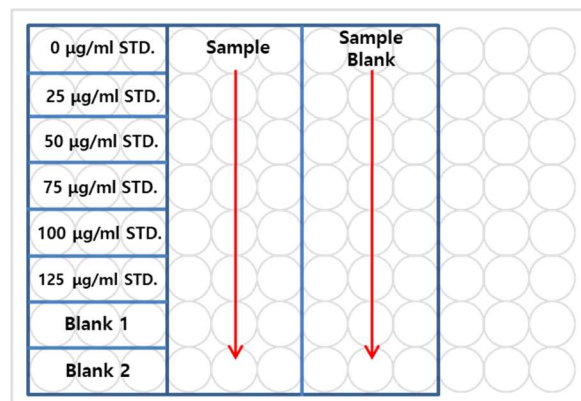
Sample Blank : sample background blank.

* Sample 의 색이 진할 경우 sample blank 로 sample 색의 흡광도 값을 보정합니다.

* DPPH Reagent Solution 은 넣는 순간부터 반응이 시작되기 때문에 맨 마지막에 넣어 반응시킵니다.

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample 은 농도별로 duplicates 이상으로 준비하세요.

- ① Trolox Standard 와 Sample, Sample Blank 에 농도별로 각 well 에 20 μl 씩 넣습니다.
- ② Blank 1, 2 에 ethanol 20 μl 를 넣습니다.
- ③ 모든 well 에 Assay Buffer 80 μl 씩 넣습니다.
- ④ Blank 2 와 Sample Blank 에 Ethanol 100 μl 을 넣습니다.
- ⑤ Trolox Standard, Sample 및 Blank 1 에 DPPH Reagent Solution 100 μl 을 넣고 Plate shaker 및 pipette 으로 잘 섞어줍니다.
- ⑥ Plate 를 빛이 차단된 실온 (25°C)에서 10 분간 반응시킵니다.
- ⑦ 반응이 끝난 plate 는 plate reader 를 사용하여 517 nm 에서 흡광도를 측정합니다.



■ Calculation

모든 결과 값은 duplicates 이상 준비하며, 평균값을 가지고 계산합니다.

✓ 계산 예시

- ① Sample, Sample Blank 값의 평균을 계산합니다.

반응농도	Sample	
ug/mL	Sample	Sample BLK
125	0.214	0.032
100	0.277	0.032
75	0.320	0.034
50	0.360	0.032
25	0.409	0.033
0	0.487	0.032
BLK1	0.661	0.000
BLK2	0.031	

- ② Sample에서 각 농도에 해당하는 Sample Blank 값을 빼 **A**를 구하고, Blank 1에서 Blank 2 값을 빼 **B**를 계산합니다.

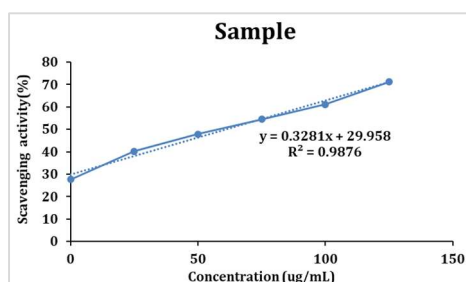
반응농도	Sample			
ug/mL	Sample	Sample BLK	A	SA(%)
125	0.214	0.032	=T28-U28	71.2
100	0.277	0.032	0.245	61.2
75	0.320	0.034	0.286	54.6
50	0.360	0.032	0.328	47.9
25	0.409	0.033	0.376	40.3
0	0.487	0.032	0.456	27.7
Blank1	0.661	0.000	B	
Blank2	0.031		0.630	

반응농도	Sample			
ug/mL	Sample	Sample BLK	A	SA(%)
125	0.214	0.032	0.181	71.2
100	0.277	0.032	0.245	61.2
75	0.320	0.034	0.286	54.6
50	0.360	0.032	0.328	47.9
25	0.409	0.033	0.376	40.3
0	0.487	0.032	0.456	27.7
Blank1	0.661	0.000	B	
Blank2	0.031		=T34-T35	

- Scavenging activity (SA, %)를 구하기 위해 앞에서 구한 **A**와 **B**의 값을 가지고, 다음 식을 이용하여 계산합니다.
- **SA (%) : $100-(A/B)*100$**

반응농도	Sample			
ug/mL	Sample	Sample BLK	A	SA(%)
125	0.214	0.032	=100-(V28/V35)*100	
100	0.277	0.032	0.245	61.2
75	0.320	0.034	0.286	54.6
50	0.360	0.032	0.328	47.9
25	0.409	0.033	0.376	40.3
0	0.487	0.032	0.456	27.7
Blank1	0.661	0.000	B	
Blank2	0.031		0.630	

- ③ Sample의 농도별 값과 SA (%) 값으로 분산형 그래프를 나타낸 후 추세선을 사용하여 수식 및 R^2 값을 표시합니다.



✓ **Total Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)**

- EC_{50} 은 scavenging activity(%) 그래프에서 $y=ax+b$ 식에 y 에 50 을 대입하여 ABTS radical 을 50% 제거하는 Trolox 농도를 구할 수 있습니다.
- Sample 도 농도별값과 흡광도값을 측정해 scavenging activity(%) 그래프로 나타낸 후 대입하여 sample 의 EC_{50} 을 구할 수 있습니다.
- TEAC 는 아래 공식을 이용하여 구합니다.

$$\text{Antioxidant Capacity (TEAC)} = \text{Trolox } EC_{50} / \text{Sample } EC_{50}$$

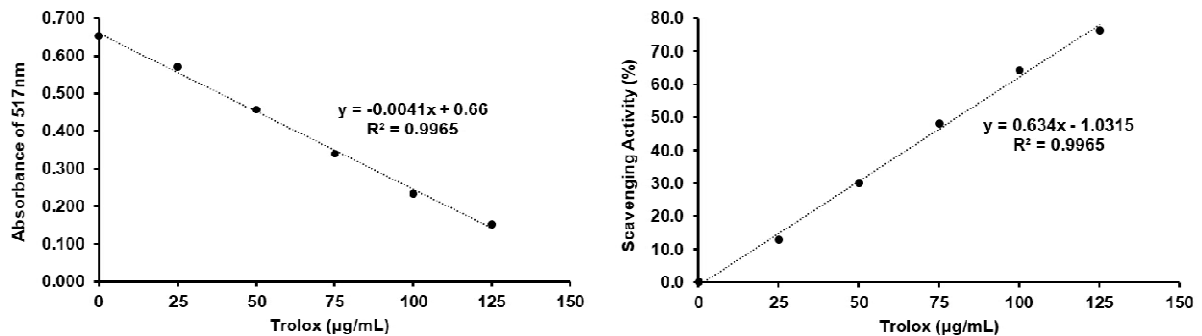


Fig. Trolox standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay