

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DP001 微板法 96 样)

一、产品简介:

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) 即 1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基。广泛用于定量测定生物试样和食品的抗氧化能力。

此法是根据 DPPH 自由基有单电子, 在 517nm 处有一强吸收, 其醇溶液呈紫色的特性。当有自由基清除剂存在时, 由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失, 呈现的颜色越浅, 即 A 值越低, 进而对样本中 DPPH 清除能力进行定量分析。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
工作液	粉剂 2 支 空瓶 2 瓶	4°C 保存	用前甩几下 EP 管使试剂落入底部, 向一支 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇溶解后全部转移至 1 支棕色空瓶中, 再向 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇涮洗后全部转移至该棕色瓶中 (可分别再用 0.5mL 无水乙醇涮洗 EP 管 2 次), 最后再加 10.5mL 无水乙醇至该棕瓶中混匀做为 工作液 待用 (总体积为 12.5mL); 用不完的试剂 4°C 避光保存 (配制好的工作液最好一个月内用完)。
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰、**甲醇**、**无水乙醇**和蒸馏水。

四、DPPH 自由基清除能力测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 新鲜组织或者称取约 0.05g 烘干样本 (将样本在 105°C 下杀青 3min, 然后 60°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 得到烘干样本), 加入 1mL 的 80% 甲醇提取液 (若鲜样需研磨均质), 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次), 若有损失需用 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 80% 甲醇提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

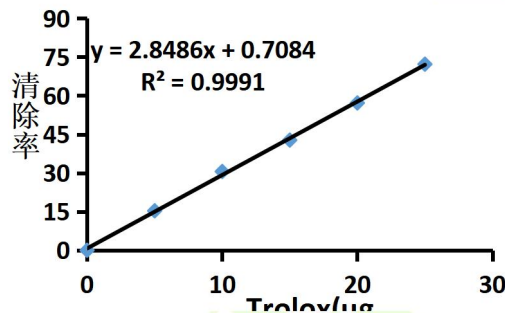
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 517nm。
- ② 不同样本清除能力不一, **可先选取 2 个样本做检测**, 若 A 测定-A 对照接近零, 需对样本进行稀释 (用 80% 甲醇提取液稀释) 后再检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	150	150	
80%甲醇		150	150
工作液	150		150
混匀, 室温 (25°C) 避光静置 30min; 12000rpm, 室温离心 5min, 取 200μL 至 96 孔板中, 于 517nm 处读取吸光值 A。			

【注】若一次性样本较多, 可用排枪或者分批检测, 以使测定管的反应时间 (避光静置 30min) 保持一致。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 2.8486x + 0.7084$; x 是标准品 Trolox 浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 是清除率 (%)。



2、DPPH 自由基清除率(%)=[(1-(A 测定-A 对照)÷A 空白)×100]%

3、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。

4、按样本质量计算:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = \frac{(\text{清除率} - 0.7084) \div 2.8486 \times V1}{(V1 \div V \times W) \times D} = 0.351 \times (\text{清除率} - 0.7084) \div W \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = \frac{(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1}{(V1 \div V \times W) \times D}$$

5、按细菌/细胞计算:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = \frac{(\text{清除率} - 0.7084) \div 2.8486 \times V1}{(V1 \div V \times 500) \times D} = 0.0007 \times (\text{清除率} - 0.7084) \div 500 \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = \frac{(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1}{(V1 \div V \times 500) \times D}$$

6、液体样本:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = \frac{(\text{清除率} - 0.7084) \div 2.8486 \times V1}{V1 \times D} = 0.351 \times (\text{清除率} - 0.7084) \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = \frac{(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1}{V1 \times D}$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---反应中样品体积, 150μL=0.15 mL;

W---样品质量, g; 500---细胞数量, 万;

Trolox 分子量---250.29; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 称取 2mg 标准品 Trolox 至一新 EP 管, 再加 2mL 甲醇充分溶解, 即 1mg/mL 标准品, 备用。
- 2 把母液用甲醇稀释成以下浓度梯度的标准品: 0.5, 10, 15, 20, 25μg/mL。
- 3 按照测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。