

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DP001 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
工作液	粉剂 2 支 空瓶 2 瓶	4℃避光 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.5mL 无水乙醇溶解后全部转移至棕色空瓶中, 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 无水乙醇至棕瓶中混匀做为工作液待用 (总体积为 12.5mL); 3. 用不完的试剂 4℃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℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、**甲醇**、无水**乙醇**、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃下杀青 3min, 然后 60℃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℃, 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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），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：

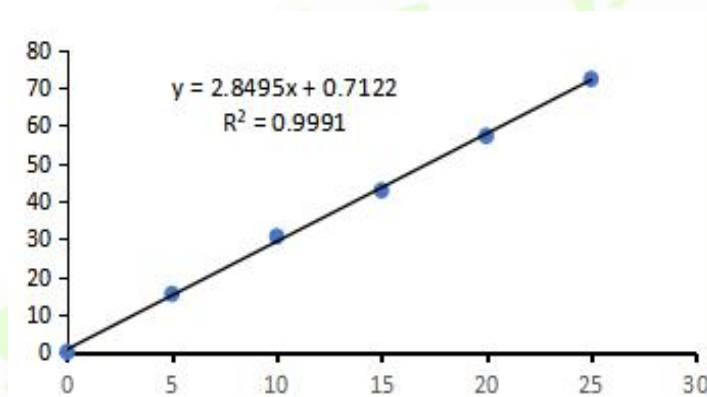
试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
样本	150	150	
80%甲醇		150	150
工作液	150		150

混匀，室温（25℃）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： $y = 2.8495x + 0.7122$ ；x 是标准品 Trolox 浓度（μg/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：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(清除率 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ = 0.3509 \times (清除率 - 0.7122) \div W \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D$$

5、按蛋白浓度计算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mg prot}) = [(清除率 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div (V_1 \div V \times C_{pr}) \times D \\ = 0.3509 \times (清除率 - 0.7122) \div C_{pr} \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mg prot}) = [(70 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div (V_1 \div V \times C_{pr}) \times D$$

6、液体样本：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = [(清除率 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div V_1 \times D \\ = 0.3509 \times (清除率 - 0.7122) \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = [(70 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div V_1 \times D$$

7、按细菌/细胞计算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = [(清除率 - 0.7122) \div 2.8495 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times D$$

$$=0.0007 \times (\text{清除率} - 0.7122) \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.7122) \div 2.8495 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

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

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管，再加 2mL 甲醇充分溶解，即 1mg/mL 标准品；
- 3 将母液用甲醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0,5,10,15,20, 25. μ g/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 3.9ml 甲醇，混匀得到 25ug/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ g/mL	0	5	10	15	20	25
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
甲醇 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，计算各标品的清除率%，以标准品 Trolox 质量（ μ g/mL）为 x，清除率%为 y，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	150	
甲醇		150
工作液	150	150
混匀，室温（25 $^{\circ}$ C）避光静置 30min；12000rpm，室温离心 5min，取 200 μ L 至 96 孔板中，于 517nm 处读取吸光值 A。		