

DPPH Removal capability Kit

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

货号: G0128W48 | 方法: 微板法 | 规格: 48 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×1 支 空瓶×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

工作液配制 (使用前现配):

- 用前甩几下 EP 管使试剂落入底部。
- 向一支 EP 管中加 0.5mL 无水乙醇溶解后全部转移至 1 个棕色空瓶中。
- 再用 0.5mL 无水乙醇涮洗 EP 管 2 次, 每次均转移至该棕瓶中。
- 最后补加 11mL 无水乙醇至该棕瓶中混匀, 总体积为 12.5mL (该试剂 4°C 避光保存)。
- 临用前将上步试剂用无水乙醇稀释 2 倍左右, 使 A 空白管为 1 ± 0.1 , 即可做为工作液待用 (配制好的工作液需 4°C 避光保存, 最好一个月内用完)。

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：

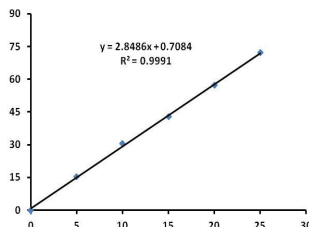
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	150	150	
80%甲醇		150	150
工作液	150		150

混匀，室温（25℃）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。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

- 1、标准曲线：y = 2.8486x + 0.7084；x 是标准品 Trolox 浓度 (μg/mL)，y 是清除率 (%)。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

- 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;

