DPPH 自由基清除能力检测试剂盒(微板法)

产品编号：MA1521　　规格：100T

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1521-1 100T	保存条件	有效期	运输条件
氮自由基提取液	100mL	RT	自生产之日起 6 个月	湿冰运输 （按季节）
DPPH 溶液	25mL	2-8℃，避光		
维生素 C	10mg	2-8℃，避光		
说明书	1 份			

产品简介

机体代谢过程中会持续生成各类自由基，自由基过量累积可诱发氧化损伤，进而导致衰老、肿瘤、中风、心肌炎、糖尿病等多种慢性疾病。2,2-二苯基-1-苦基苯肼（DPPH）是性质较为稳定的自由基；当体系中存在自由基清除剂时，其溶液颜色可由紫色转变为黄色，吸光度随之降低。

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒(微板法)，即 DPPH Free Radical Scavenging Capacity Assay Kit，也可称作氮自由基清除能力/清除率检测试剂盒。其检测原理为：DPPH 为稳定的含氮自由基，带有一个单电子，乙醇溶液呈紫色，在 517 nm 波长处有特征强吸收。若待测样品能够提供电子并与其单电子配对，溶液将发生褪色，且褪色程度与接受电子的量成正比。通过测定吸光度下降幅度，即可计算样品对 DPPH 自由基的清除能力。本试剂盒适用于血清、植物组织、抗氧化物、药物等多种样本的检测。

自备材料

1. 植物组织(芹菜、玉米等叶片)、血液、蒸馏水、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸等实验材料

2. 研钵或匀浆器、粉碎机或超声破碎机、离心机、离心管、恒温水浴锅、恒温干燥箱

使用方法(仅供参考)

1. 准备样品：

① 植物样品：取新鲜植物样本，清洗干净，用研钵研碎(粉碎)，在干燥箱烘干后过筛，称取 0.05g 样品，加入 0.8mL 氮自由基提取液，40℃水浴浸提 30~60min，10000rpm 离心 10min，上清液待用，2-8℃保存备用(亦可参考相关资料提取方法)。

② 血浆、血清和尿液样品：血浆(用肝素或枸橼酸钠抗凝，不宜使用 EDTA 抗凝) 4℃，5000rpm 离心 10min，取上清液待用；血清或尿液样品可直接测定。

③ 细胞样品：按每 5×10^6 个细胞加入 0.8mL 氮自由基提取液，超声破碎(功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，10000rpm 离心 10min，取上清液待用。

④ 果汁、葡萄酒等样品：按样品:氮自由基提取液=1:9 的比例振荡混匀，10000rpm 离心 10min，上清液待用，2-8℃保存备用。

⑤ 高活性样品：如果样品中有效浓度较高，可用提取液进行恰当的稀释。

2. 配制维生素 C 溶液：将一支 10mg 维生素 C 充分溶解于 1mL 氮自由基提取液中，即成 10mg/mL

维生素 C 溶液；可分成 0.1mL 的小份，-20℃保存。

3. 配制 Vc 标准工作液：如需测线性关系，建议用氮自由基提取液将 10mg/mL 维生素 C 溶液稀释至 50、40、30、20、10、5μg/mL 的 Vc 标准工作液；如需清除率大于 90%的阳性对照，建议选用大于 50μg/mL 的 Vc 标准工作液。

4. 预热酶标仪：酶标仪开机预热 30min 以上，调节波长 517nm(500~530nm 亦可)，无水乙醇调零。

5. DPPH 加样：按照下表设置空白管、样本测定管、样本对照管、阳性对照管，溶液应按照顺序依次加入，混匀，室温避光静置 30min。

加入物(mL)	空白管	样本测定管	样本对照管	阳性对照管(标准管)
氮自由基提取液	0.05	—	—	—
上清液	—	0.05	0.05	—
Vc 标准工作液	—	—	—	0.05
无水乙醇	0.225	0.225	0.45	0.225
DPPH 溶液	0.225	0.225	—	0.225

6. OD 值测定：将各管溶液室温 12000rpm 离心 5min，取上清 300μL 加至 96 孔板中，用酶标仪检测各管吸光度值，依次记为 A_0、A_1、A_2、A_3。

7. 计算：

阳性对照 DPPH 清除率(%)= (A_0- A_3)/A_0×100%

待测样本 DPPH 清除率(%)=[A_0-(A_1- A_2)]/A_0×100%

备注：A_0=空白管的吸光度值

A_1=样本测定管的吸光度值

A_2=样本对照管的吸光度值

A_3=阳性对照管的吸光度值

注意事项

1. 正式测定之前建议选择 2~3 个预期差异较大的样本做预实验。

2. 实验材料应尽量新鲜，当天提取当天测定。

3. 不同样本清除 DPPH 自由基的能力差异很大。如样本 DPPH 清除率大于 90%，应用提取液稀释；如样本 DPPH 清除率小于 5%，应提高样本用量以提高有效成分浓度。

4. 当样品活性较低时，可通过提高上清液加入量或减少 DPPH 溶液加入量来增加检测的灵敏度。

5. 不同批次生产的 DPPH 溶液初始吸光度值可能有差异，根据实际情况，DPPH 溶液可用无水乙醇稀释 1~2 倍后使用。(参见附录 2)

6. 样品中不宜添加 Triton、DTT 等可能影响氧化还原反应的成分。

7. 本方法受反应时间、DPPH 初浓度、样品性质的影响，还受到光照、氧气、pH 值、有机离子、无机离子等外界因素的影响。

8. 如果样品提取液 pH 值偏碱性，将可能导致样本测定管吸光度大于空白管吸光度，使清除率为负值，

可用氢氧化钠等调整 pH 至中性。

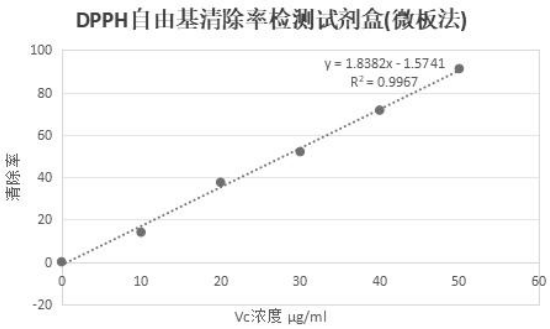
9. 所有试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

10. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

11. 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

附录1(仅供参考)：标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，对系列Vc标准工作液（60、50、40、30、20、10μg/ml）进行吸光度的测定，其数值及标准曲线如下(仅供参考)：

	初始吸光度值	调零吸光度值	DPPH 清除率
无水乙醇	0.039		
空白管	0.641	0.602	0
Vc 标准 10μg/mL	0.557	0.518	13.95348837
Vc 标准 20μg/mL	0.415	0.376	37.54152824
Vc 标准 30μg/mL	0.328	0.289	51.99335548
Vc 标准 40μg/mL	0.21	0.171	71.59468439
Vc 标准 50μg/mL	0.092	0.053	91.19601329
Vc 标准 60μg/mL	0.075	0.036	94.01993355



由上图可知：Vc 标准工作液在 0~50μg/mL 时线性关系良好，DPPH 清除率与 Vc 浓度呈正相关，当 Vc 浓度大于 50μg/mL 时，DPPH 清除率接近最大值，数据有偏差。

附录 2(仅供参考)：用无水乙醇将 DPPH 溶液分别稀释 1 倍和 2 倍后，Vc 标准分别在 0~28μg/mL 和 0~20μg/mL 时线性关系良好，DPPH 清除率与 Vc 浓度呈正相关，数据参考如下：

	无水乙醇+DPPH 溶液(1+1)		无水乙醇+DPPH 溶液(2+1)	
	调零吸光度值	DPPH 清除率	调零吸光度值	DPPH 清除率
空白管	0.304	0	0.209	0
Vc 标准 1μg/mL	0.274	9.868421053	0.204	2.392344498
Vc 标准 4μg/mL	0.256	15.78947368	0.171	18.18181818
Vc 标准 6μg/mL	0.237	22.03947368	0.143	31.57894737
Vc 标准 8μg/mL	0.219	27.96052632	0.127	39.23444976
Vc 标准 10μg/mL	0.19	37.5	0.097	53.58851675
Vc 标准 15μg/mL	0.157	48.35526316	0.053	74.64114833
Vc 标准 20μg/mL	0.079	74.01315789	0.012	94.25837321
Vc 标准 30μg/mL	0.018	94.07894737	0.01	95.215311

大连美仑生物技术有限公司
官网:https://www.meilunbio.com/
电话/邮箱:0411-62910999 sales@meilune.com
本产品仅供科研使用