# DPPH 自由基清除能力检测试剂盒(分光法)

**产品编号：MA1522　　规格：48T**

## 产品组成和保存/运输条件

| 产品组成 | MA1522-1<br>48T | 保存条件 | 有效期 | 运输条件 |
|---|---|---|---|---|
| 试剂一 | 粉末×2 | 2-8℃，避光 | 自生产之日起<br>6 个月 | 湿冰运输<br>（按季节） |
| 标准品 | 粉末×1 | 2-8℃ | | |
| 空白瓶(棕色) | 30mL×2 | RT | | |
| 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(分光法)，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。

## 使用方法(仅供参考)

建议正式实验前，选取 2 个样本做预测定，了解实验样品情况，熟悉流程，避免样本和试剂浪费。

**1.工作液配制：**取一支试剂一，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一个棕色空瓶中，再向该 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 无水乙醇涮洗该 EP 管 2 次)，最后再加 17mL 无水乙醇至该棕瓶中混匀作为工作液待用(总体积为 19mL)。用不完的试剂 2-8℃避光保存(配制好的工作液最好一个月内用完)。

**2.准备样品：**

① 组织样本：

a.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；

b.12000rpm，室温离心 10min，取上清待测。

**【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 的比例提取。**

② 细菌或细胞样本：

a.收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；

b.取约 $5\times10^6$ 个细菌或细胞加入 1mL 80%甲醇提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；

c.12000rpm，室温离心 10min，取上清测定。

**【注】若增加样本量，可按每 0.5~1×10⁷ 个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。**

③ 液体样本：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

**3. 样品测定：**

① 可见分光光度计预热 30min，设定波长到 517nm，无水乙醇调零。

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。

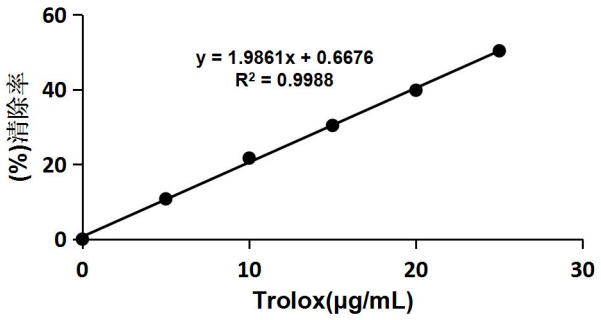
③ 在离心管中依次加入：

| 加入物(μL) | 测定管 | 对照管 | 空白管 |
|---|---|---|---|
| 样本 | 400 | 400 | - |
| 80%甲醇 | - | 600 | 400 |
| 工作液 | 600 | - | 600 |
| 混匀，室温(25℃)避光静置 30min，12000rpm，室温离心 5min，取 800μL 至 1.0mL 微量比色皿(光径 1cm)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。**

**4. 计算：**

① 标准曲线：**y = 1.9861x +0.6676**；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 按照样本质量计算：

**DPPH 自由基清除能力(μg Trolox/g 鲜重)**

**=[(清除率-0.6676)÷1.9861×$V_1$]÷($V_1$÷V×W) ×D**

**=0.503×(清除率-0.6676)÷W×D**

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

DPPH 自由基清除能力(μg Trolox/g 鲜重)=[(70-0.6676)÷1.9861×$V_1$]÷($V_1$÷V×W) ×D

⑤ 按照细菌/细胞计算：

**DPPH 自由基清除能力(μg Trolox/$10^4$ cell)**

**=[(清除率-0.6676)÷1.9861×$V_1$]÷($V_1$÷V×500) ×D**

**=0.503×(清除率-0.6676)÷500×D**

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

DPPH 自由基清除能力(μg Trolox/$10^4$ cell)=[(70-0.6676)÷1.9861×$V_1$]÷($V_1$÷V×500) ×D

⑥ 液体样本：

**DPPH 自由基清除能力(μg Trolox/mL)**

**=[(清除率-0.6676)÷1.9861×$V_1$]÷$V_1$×D**

**=0.503×(清除率-0.6676)×D**

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

DPPH 自由基清除能力(μg Trolox/mL)=[(70-0.6676)÷1.9861×$V_1$]÷$V_1$×D

**V--加入提取液体积，1 mL**

**$V_1$---反应中样品体积，150μL=0.15mL**

**W---样品质量，g**

**D---稀释倍数，未稀释即为 1**

**Trolox 分子量----250.29**

**500---细胞数量，万**

**附：标准曲线制作过程：**

① 制备标准品母液(1mg/mL)：称取 2mg 标准品即 Trolox 至离心管，加入 2mL 的甲醇，充分溶解混匀。

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。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

③ 按照测定管的加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。

## 注意事项

1. 若想要重新做标曲，则使用试剂盒中的标准品试剂。正常情况直接代入现有公式即可。
2. 所有试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 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。



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