

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0706	DPPH 自由基清除能力试剂盒 (微量法)	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 80mL × 1 瓶	4℃
试剂一	无水乙醇 30mL × 1 瓶 (自备)	室温
试剂二	粉剂 × 1 支: 1.5 mL EP 管放于 8 mL 试剂瓶中, 临用前加入 4.05 mL 试剂一振荡溶解, 用不完的试剂可于-20℃保存一月, 建议分装保存。	4℃
临用前根据试验所需量按照试剂二: 试剂一 (V:V) = 4: 21 的比例配制成工作液, 现配现用, 用不完的工作液可于 4℃保存一周。		
试剂三	粉剂 × 1 支: 10mg 维生素 C, 临用前加入 1mL 提取液, 充分振荡溶解; 配成 10mg/mL 的维生素 C 溶液, 用于阳性对照。	4℃, 避光

一、产品说明

DPPH 自由基一种很稳定的氮中心的自由基, 是样本抗氧化能力的重要指标之一, 广泛应用于抗氧化类食品、保健品及药品的研究中。

DPPH 自由基有单电子, 其醇溶液呈紫色, 在 515 nm 处有强吸收。当有抗氧化剂存在时, DPPH 自由基被清除, 其溶液颜色变浅, 515 nm 的吸光度下降, 在一定范围内其吸光度的变化与自由基被清除的程度成正比。本试剂盒中, 通过吸光度下降的程度来反映样本清除 DPPH 自由基的能力。

二、自备材料

恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、台式离心机、无水乙醇、研钵/粉碎机、烘干箱、30~50 目筛和蒸馏水。

三、样品准备

- 1、植物组织: 将新鲜样品置于 60℃ 烘箱烘干至恒重, 研钵研碎 (或粉碎机粉碎), 过 30~50 目筛; 称取约 0.05 g 样本, 加入 1 mL 提取液后置于 40℃ 水浴锅中浸提 30 min; 10000 rpm 室温离心 10 min, 取上清, 置于冰上待测。
- 2、动物组织: 收集 0.1g 组织, 加入 1.0mL 提取液, 匀浆或超声以充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物, 4℃、10000rpm 离心 5min, 取上清待测。
- 3、细胞/细菌: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (104 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 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); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

4、红酒、果汁等液体样本：吸取 100 μ L 样本溶液加入 900 μ L 提取液，旋涡振荡混匀，室温 10000 rpm 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

5、提取物或者药物：可用提取液配制成一定浓度，如 5 mg/mL。

四、操作步骤

正式测定前，必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

1、分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 515 nm，无水乙醇调零。

2、阳性对照的准备：若需要线性关系，建议将 10 mg/mL 的维生素 C 溶液用提取液配制成 0.3、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 mg/mL 的维生素 C 溶液待用；若需要清除率约为 100%的阳性对照，则建议将 10 mg/mL 维生素 C 溶液用提取液配制成大于 0.3 mg/mL 的维生素 C 溶液待用。

3、在 96 孔板或 EP 管中分别加入下列试剂：

试剂名称 (μ L)	空白管	测定管	对照管	阳性对照管
上清液		10	10	
标准溶液				10
提取液	10			
试剂一			190	
工作液	190	190		190

混匀后室温避光静置 30 min。测定 515 nm 处的吸光度。空白管、对照管、标准管和测定管的吸光值分别记为 A 空、A 对、A 阳性对照管和 A 测。空白管只需测 1-2 次。

五、计算公式

1、阳性对照的自由基清除率计算公式：

DPPH 自由基清除率 $D_{vc}\% = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{阳性对照}}) \div A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

2、样本的自由基清除率计算公式：

DPPH 自由基清除率 $D\% = [(A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})) \div A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

六、注意事项

1、不同样本清除 DPPH 自由基的能力可能相差很大，如果要比较不同样品的 DPPH 自由基清除能力，建议对于同一批样品加入等量的样品，红酒、组织匀浆、果汁等液体样品加入同样体积，提取物（或者药物）配制成同样浓度。在比较时，将样本根据预实验结果进行适当调整，比较同样浓度（相同稀释倍数）的清除率大小。

2、样本建议当天提取当天检测。