DPPH 自由基清除率检测试剂盒（微板法）

产品简介:

在生命活动的代谢过程中不断产生各种自由基，而自由基的积累会使机体产生氧化损伤而引起衰老、肿瘤、中风、心肌炎和糖尿病等慢性疾病，在众多自由基中 2， 2- 二苯基 -1- 苦基苯肼（DPPH) 是一种较稳定的自由基，当有自由基清除剂存在时颜色由紫色向黄色转变，吸光度随之变小。

DPPH 自由基清除率检测试剂盒（微板法）又称氮自由基清除能力检测试剂盒或氮自由基清除率检测试剂盒，其检测原理是 DPPH 自由基是一种较稳定的含氮自由基，含一个单电子，溶于乙醇后溶液呈紫色，在 517nm 下有强吸收，如果有其他物质提供一个电子与此单电子配对，溶液会褪色，褪色程度与接受电子的量呈正比，通过吸光度下降的程度来反应样品的氮自由基清除能力，主要用于检测血清、植物组织、抗氧化类食品、保健品及药品等样本。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTO1141 100T	Storage
试剂 (A): 氮自由基提取液	100ml	RT
试剂 (B): DPPH 溶液	25ml	4℃ 避光
试剂 (C): 维生素 C	10mg	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、实验材料：植物组织（芹菜、绿豆、玉米等叶片）、血液、蒸馏水、无水乙醇等

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

电子天平、 30~50 目筛、酶标仪、 96 孔板

操作步骤(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，研钵研碎（粉碎），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，离心 10min，上清液待用， 4℃ 保存备用（亦可参考相关资料提取方法提取）。

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℃ 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），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 的比例震荡混匀，离心 10min，上清液待用， 4℃ 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、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。

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：取 96 孔板，将各管溶液依次吸取 300ul 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。

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、 如样品活性较低时，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。

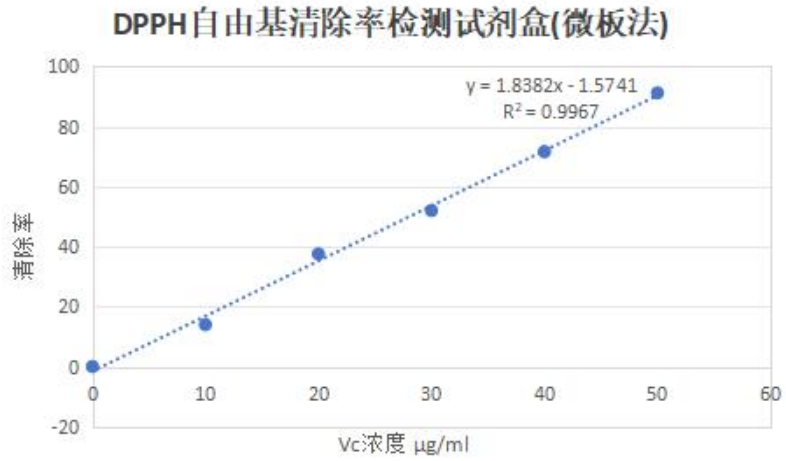
7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

8、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期： 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

附录 1：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：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

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDP0013	GUS 染色液 (即用型)
GCPE0025	SDS-PAGE 蛋白加样缓冲液 (5×, 含 DTT)
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCPW0053	Western 抗体洗脱液 (碱性)
GCTC1167	尿素 (Urea) 检测试剂盒 (脲酶波氏比色法)

