

DPPH 自由基清除能力

规格：分光光度法 48 样,带标准品

编号：TW54020

检测原理：DPPH 法

检测波长：515nm

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药学研究中常常检测血浆、血清、唾液、尿液等各种体液，细胞或组织等裂解液、植物或中草药抽提液及各种抗氧化物(antioxidant)溶液的总抗氧化能力。

测定原理：

DPPH 为稳定的自由基，在醇溶液中呈紫色，515nm 波长处有强吸收。当有抗氧化剂存在时，溶液会发生脱色反应且吸光值变小，借此可评估清除自由基的能力。

自备仪器和用品：

恒温水浴锅、低温离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃/石英比色皿、80%甲醇(重做标曲使用)和蒸馏水。

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 80mL	x1	4℃	
试剂一	液体 40mL	x1	4℃,避光	
标准品	粉剂	x1	4℃,避光	1mg Trolox 标准粉剂

---

**样品提取（按照步骤依次操作）：****一、血清、血浆、唾液或尿液等液体样品**

血浆（制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝，不宜使用 EDTA 抗凝）5000rpm 4℃离心 10min，取上清待测；

血清、唾液或尿液样品直接用于测定，也可以-80℃冻存（不宜超过 30 天）后再测定；

**二、组织样品**

1、按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆；

2、然后 10,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**三、细胞样品**

1、按照细胞数量（ $10^4$ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；

2、然后 10,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

## 实验准备：

- 1、分光光度剂预热 30min，调节波长至 515nm；

## 测定操作：

- 1、在 EP 管中依次操作

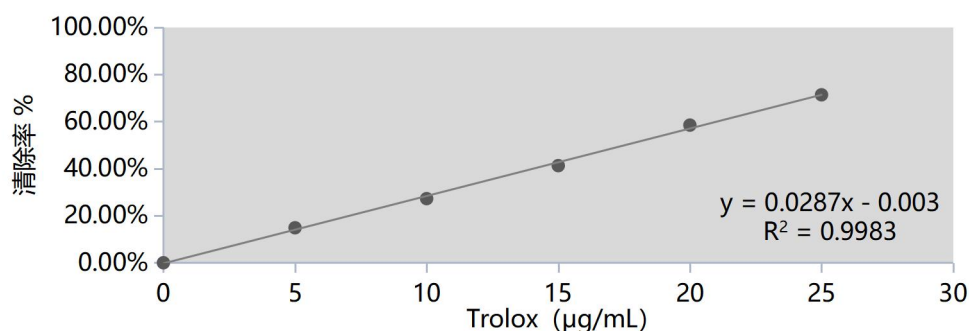
试剂名称 (μL)	测定管	对照管 (*选做)	空白管 (*只做一管)
样本	400	400	-
提取液	-	600	400
试剂一	600	-	600
混匀，室温 (25℃) 避光反应 30min 于 515nm 波长，等体积提取液调零，测定各管吸光值 A			

## 注意：

- 1、有色样本需设立对照管，无色样本可以不做对照管；
- 2、建议选择几个差异较大的样本做预实验，如果反应结束后出现浑浊或沉淀，建议扩大反应体系操作（例如测定管：480μL 样本+720μL 试剂一，对照管和空白管体系与测定管同步放大），混匀，室温 (25℃) 避光反应 30min。反应结束后 8,000rpm 室温离心 5min，取 1mL 上清液于玻璃/石英比色皿测定 515nm 吸光值；
- 3、若 A 测定或(A 测定-A 对照) <0.05，说明清除能力过高，需对样本使用提取液稀释，稀释倍数 D 代入公式计算；
- 4、注意每管操作间隔不易过长，若一次性样本较多，建议分批检测；
- 5、试剂一为 DPPH/甲醇溶液，易挥发，反应时建议密封；
- 6、操作时应在通风条件良好的环境中进行，以免吸入过量甲醇中毒；

## 结果计算：

### 一、以 DPPH 自由基清除率表示



$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = (1 - [(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div A_{\text{空白}}]) \times 100\%$$

或

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = (1 - [A_{\text{测定}} \div A_{\text{空白}}]) \times 100\%$$

### 二、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示

#### (1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) \\ = (\text{清除率}\% \div 100\% + 0.003) \div 0.0287 \times V \div W \times D \end{aligned}$$

#### (2) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mg prot}) \\ = (\text{清除率}\% \div 100\% + 0.003) \div 0.0287 \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

#### (3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) \\ = (\text{清除率}\% \div 100\% + 0.003) \div 0.0287 \times V \div \text{细胞数量(万个)} \times D \end{aligned}$$

#### (4) 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) \\ = (\text{清除率}\% \div 100\% + 0.003) \div 0.0287 \times D \end{aligned}$$

V: 加入提取液体积, 1mL;

W: 样品质量, g;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

Trolox 分子量, 250.29;

**预实验的意义：**

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

### 附：标准曲线的绘制（选做）

- 1、标准品<sup>①</sup> 管中加入 2mL 80%甲醇 充分溶解即为 0.5mg/mL;
- 2、将标准品(0.5mg/mL) 使用 80%甲醇稀释为 25、20、15、10、5、0 μg/mL;  
(也可根据自身实验需求调整标准品浓度)
- 3、依据以下测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线

试剂名称 (μL)	标准管	空白管 (*只做一管)
标准品	400	-
80%甲醇	-	400
试剂一	600	600
混匀，室温（25℃）避光反应 30min 于 515nm 波长，等体积 80%甲醇调零，测定各管吸光值 A		

清除率 (%) =  $x$  为标准管浓度μg/mL,  $y$  为吸光值  $(1-[A_{\text{标准}} \div A_{\text{空白}}]) \times 100\%$

<sup>①</sup> 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖