

### . 概述

活性氧具有调节许多重要细胞功能的作用，它和人体衰老、多种人类疾病，如癌症、糖尿病有关。自旋捕捉ESR技术是一种检测活性氧的最可靠的办法，它能提供具有特征的ESR信号。DMPO采用一种特殊的敏感方法，可以捕捉超氧阴离子和羟自由基等，分别产生独特的ESR光谱。因此它是探测生物系统内ROS的强有力工具。同仁化学研究所的DMPO具有很高的纯度，和其他产品相比，它的最大优点是使用前不需要再纯化，使您的ESR检测变得更容易。

### . 常规参数

名称：5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide

性状：无色液体

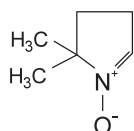
纯度：99% (GC)

分子量：113.16, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO

保存条件：-20℃，防潮，避光

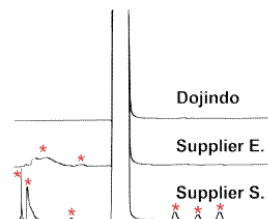
运输条件：蓝冰

CAS：3317-61-1

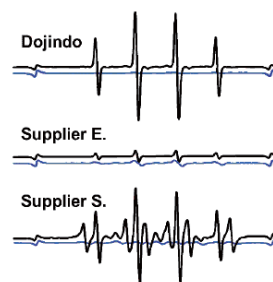


### . 纯度对比

同仁化学研究所 (Dojindo) 的DMPO没有杂质 (\*) 检出



以羟自由基的Fenton反应(黑色)和空白(蓝色)为例  
同仁化学研究所(Dojindo)的峰更清晰，S/N比例更高



### . 操作步骤

常规检测步骤 (\*本数据仅供参考，具体参数可能因仪器厂家的不同而适当调整)

#### SOD清除超氧阴离子的活性检测

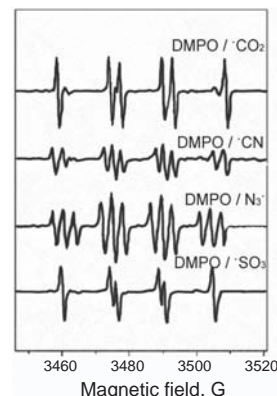
1. 将15 μl的DMPO溶液和 50 μl的5 mM的次黄嘌呤加入到35 μl的0.1 M的磷酸盐缓冲液 (pH 7.8) 中。
2. 加入50 μl的待测SOD标准品或待测样品，涡旋振荡 1-2 s。
3. 加入50 μl的0.4 U/ml的黄嘌呤氧化酶之后立即涡旋振荡。
4. 放置一段时间 (例如 1 min) 将溶液转入ESR样品管中检测。
5. 通过峰值计算相对强度(DMPO-O<sup>2-</sup>/Mn<sup>2+</sup>)。

## V. 实验例

### C-,N-,S-基自由基的检测

1. 制备100 mM含有25 μM Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA)的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)，作为过渡金属螯合剂。
2. 制备以下过氧化物酶底物：A) 100 mM 甲酸钠(HCOONa)；B) 100 mM氰化钾(KCN)；C) 100 mM叠氮钠(NaN<sub>3</sub>)；D) 含有100 mM亚硫酸钠 (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)的100 mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)。
3. 制备4.0 mg/ml(~100 μM)的辣根过氧化物酶 (HRP)溶液和1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液。
4. 制备浓度为1 M的DMPO溶液。
5. 在离心管中加入130 μl的缓冲液，加入20 μl已配好的1 M的DMPO溶液，再加入20 μl底物储存液，10 μl的1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液，最后加入20 μl HRP触发反应。
6. 涡旋振荡离心管，加入到进样系统中，检测图谱。
7. 加样后调节光谱并得到图谱。

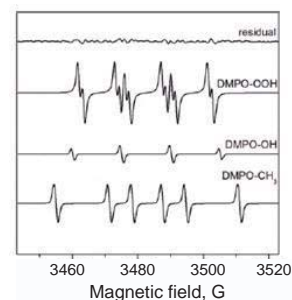
各物质的终浓度为：100 mM DMPO，10 mM的底物，50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，10 μM HRP。



## 超氧阴离子操作流程

1. 制备100 mM含有25  $\mu$ M Diethylenetriaminepentaacetic Acid(DTPA)的磷酸盐缓冲液(pH 7.4), 作为过渡金属螯合剂。
2. 制备100 mM含有1 mM次黄嘌呤的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。
3. 制备浓度为1 U/ml的黄嘌呤氧化酶溶液。
4. 制备浓度为1 M的DMPO溶液。
5. 在离心管中加入70  $\mu$ l缓冲液。再加入20  $\mu$ l已配好的1 M DMPO溶液以及100  $\mu$ l的1 mM次黄嘌呤保存液。
6. 加入10  $\mu$ l的黄嘌呤氧化酶触发反应, 涡旋振荡离心管后将溶液转移至进样系统中。
7. 加样后调节光谱并得到图谱。

各物质的终浓度为: 100 mM DMPO, 0.5 mM次黄嘌呤, 0.05 U/ml黄嘌呤氧化酶。



## . 参考文献

1. Ravindra Kale, *et al.*, Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, 114(11), 2988-2993
2. Colleen M. Courtney, *et al.*, Potentiating antibiotics in drug-resistant clinical isolates via stimuli-activated superoxide generation, *Science Advances*, **2017**, 3(10), e1701776
3. Wei Zhang, *et al.*, Prussian Blue Nanoparticles as Multienzyme Mimetics and Reactive Oxygen Species Scavengers, *Journal of the American Chemical Society*, **2016**, 138(18), 5860-5
4. Daniel J. Conklin, *et al.*, Genetic Deficiency of Glutathione S-Transferase P Increases Myocardial Sensitivity to Ischemia-Reperfusion Injury, *Circulation Research*, **2015**, 117(5), 437-49
5. Adrienne L. King, *et al.*, Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2014**, 111(8), 3182-3187
6. Yang Song, *et al.*, Nonenzymatic displacement of chlorine and formation of free radicals upon the reaction of glutathione with PCB quinones, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2009**, 106(24), 9725-9730
7. Melissa L.T. Teoh, *et al.*, Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase Attenuates Heparanase Expression and Inhibits Breast Carcinoma Cell Growth and Invasion, *Cancer Research*, **2009**, 69(15), 6355-63
8. Matthew B. West, *et al.*, Cardiac Myocyte-Specific Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury by Preventing Mitochondrial Permeability Transition, *Circulation*, **2008**, 118(19), 1970-8
9. Suwimol Kaewpila, *et al.*, Manganese Superoxide Dismutase Modulates Hypoxia-Inducible Factor-1A Induction via Superoxide, *Cancer Research*, **2008**, 68(8), 2781-8