

## 氧基抗氧化能力 ORAC 试剂盒

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法

编号：ml300874

**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：

氧基抗氧化能力 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) 是一种检测各种样品中生物分子抗氧化能力的经典方法。ORAC 方法对抗氧化性能的评价具有特异性好、灵敏度高、测定范围广, 以及适合抗氧化活性的高通量筛选等优点, 在天然产物抗氧化提取物中得到越来越多的应用, 食品及功能食品企业普遍采用 ORAC 作为功能食品的重要评价标准。

### 测定原理：

以荧光素钠为荧光探针, 偶氮类化合物 AAPH 作为过氧自由基来源, 根据自由基破坏荧光探针, 使荧光强度产生变化, 荧光强度的变化大小反映自由基破坏的程度。在抗氧化剂存在时, 它可以抑制由自由基引起的荧光变化, 抑制程度反映了它对自由基的抗氧化能力。

### 需自备的仪器和用品：

天平、丙酮、PBS、离心机、烘箱、荧光酶标仪、黑色 96 孔板、匀浆器。

### 试剂组成和配制：

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
提取液	液体 100mL	X2	4°C	
试剂一	液体 250 $\mu$ L	x1	-20°C,避光	临用前用提取液稀释 100 倍, 充分混匀, 现配现用。用不完的试剂一可以分装冻存, 避免反复冻融。
试剂二	粉剂	X1	-20°C,避光	临用前, 根据实验用量自行称取, 称取 19mg 加入 1mL 提取液混匀溶解, 现配现用。
标准品	液体 500 $\mu$ L	X1	-20°C,避光	Trolox (5 mM), 用不完的标准品可以分装冻存, 避免反复冻融。

## 样品处理

(1) **细菌或培养细胞**: 先收集细菌或细胞到离心管内用冷的 PBS 清洗, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次); 10000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

(2) **植物组织**: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液捣碎, 冰浴超声破碎 5min (功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次), 然后 10000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

(3) **动物组织**: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 10000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

(4) **血清 (浆) 样品**: 用提取液稀释 100 倍或更多进行检测。

(5) **液体样本**: 10000g, 4°C 离心 10min, 去除微粒, 取上清液, 置冰上待测。在进行测定之前, 根据需要 稀释上清液。

(6) **亲脂性样本**: 溶于 100% 丙酮中, 用 50% 丙酮稀释, 在室温下孵育 1h, 10000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。在进行测定之前, 根据需要稀释上清液。

(7) **固体或高蛋白样本**: 称取固体样本, 加入去离子水 (1:2, w/v), 冰浴匀浆, 10000g, 4°C 离心 10min, 取水溶性部分的上清液。不溶物部分用去离子水洗涤, 将此洗涤液与水溶性的上清液混合, 合并的上清液 可以用提取液稀释并直接用于分析。而不溶物部分加入纯丙酮 (1:4, w/v) 在室温下混合 30-60 min 来进一步提取。10000g, 4°C 离心 10min, 取丙酮提取物的上清液用 50% 丙酮稀释。通过将水溶性 部分和不溶物部分的丙酮提取物的结果相结合, 计算出总 ORAC 值。

## 实验准备:

- (1) 荧光酶标仪调节到 37°C 预热 30min 以上, 激发波长为 485nm, 发射波长为 525nm。
- (2) 将标准品 Trolox (5 mM) 用提取液稀释到 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 0  $\mu\text{mol/L}$ 。

## 测定操作表:

	空白管	测定管	标准管
样本 ( $\mu\text{L}$ )	-	25	-
标准品 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	25
提取液 ( $\mu\text{L}$ )	25	-	-
试剂一	150	150	150
混匀, 37°C 孵育 30min			
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	25	25	25
充分混匀, 立即用荧光酶标仪读取荧光值, 每 5min 读取 1 次, 总共 60min。 激发波长为 485nm, 发射波长为 525nm, 温度 37°C。			

**注意:** 如果  $\Delta A > 10$  可以用提取液稀释,  $\Delta A < 0.4$  可以提高样本量。

### 计算公式:

ORAC 值根据荧光衰减曲线下净面积(AreaUndertheCurve,AUC)=[AUC 待测样(抗氧化剂)-AUC(空白)]计算

抗氧化剂的活性。

1. 从下面的等式计算 AUC

AUC=

(RFU0+RFU5+RFU10+RFU15+RFU20+RFU25+RFU30+RFU35+RFU40+RFU45+RFU50+RFU55+RFU60) / RFU0

RFU<sub>x</sub>=x min 的相对荧光值。(例如, RFU5 是 5min 时的相对荧光值)

2. 计算净 AUC: NetAUC=AUC(样本)-AUC(空白)。

3. 标准曲线的绘制: 以标准品浓度(umol/L)为 x 轴, 净 AUC 为 y 轴, 绘制标准曲线。

(1) 按样本质量计算:

ORAC(μmol TE/g)=y÷W÷1000×n

(2) 按细菌或细胞数量计算:

ORAC(μmol TE/10<sup>4</sup>)=y÷N÷1000×n

(3) 按样本体积计算:

ORAC(μmol TE/L)=y×n

W: 样本鲜重, g;            1000: 1μmol/mL=1000μM;            n: 样本稀释倍数;

N: 细胞或细菌数量, 以 10<sup>4</sup> 为单位 (例如细胞数量为 5×10<sup>6</sup>, N=500)。

### 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。