

羟基抗氧化能力 HORAC(荧光法)试剂盒

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法

编号：ml300880

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：

HORAC 测定填补了传统抗氧化检测方法无法评估“预防性”抗氧化能力的空白，尤其适用于识别那些通过螯合金属离子来抑制羟自由基生成的物质——这正是许多天然多酚类抗氧化剂的核心作用机制。

测定原理：

以荧光素钠为荧光探针，类芬顿反应产生羟自由基，根据羟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、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	
提取液	液体 100mL	X2	4℃	
试剂一	液体 500μL	x1	-20℃,避光	临用前用提取液稀释 100 倍充分混匀，现配现用。用不完的试剂一分装冻存避免反复冻融。
试剂二	液体 500μL	X1	-20℃,避光	临用前取出 243μL 与 757μL 蒸馏水充分混匀，现用现配，不可保存。
试剂三	粉剂	X2	-20℃,避光	临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解，现用现配。
标准品	粉剂	X1	-20℃,避光	没食子酸（临用前称取 1.7271mg 加入 10mL 提取液充分溶解即为 1000μmol/L）现用现配，不可保存。

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提取液清洗, 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); $10000 \times g$ $4^\circ C$ 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 $10000 \times g$, $4^\circ C$ 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, $10000 \times g$, $4^\circ C$ 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**: $10000 \times g$, $4^\circ C$ 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, $10000 \times g$, $4^\circ C$ 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, $10000 \times g$, $4^\circ C$ 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 至 60 min 来进一步提取。 $10000 \times g$, $4^\circ C$ 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 $37^\circ C$ 预热 30min 以上, 激发波长为 485nm, 发射波长为 525nm。

2、将标准品没食子酸 ($1000 \mu mol/L$) 用提取液稀释到

10, 30, 50, 70, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu mol/L$, 按照测定操作表绘制标曲。

3、标准孔和空白孔一般只做 1 次

测定操作表: 于全黑 96 孔板中按照如下方式操作

	空白管	测定管	标准管
样本 (μL)	-	10	-
标准品 (μL)	-	-	10
提取液 (μL)	10	-	-
试剂一	170	170	170
混匀, $37^\circ C$ 孵育 30min			
试剂二 (μL)	10	10	10
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 $37^\circ C$ 。			

计算公式:

HORAC 值根据荧光衰减曲线下净面积(Area Under the Curve,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

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

RFU0=0 min 的相对荧光值。

RFUX=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: Net AUC=AUC(样本)-AUC(空白)。

3. 标准曲线的绘制:以标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)为 x 轴,净 AUC 为 y 轴,绘制标准曲线。 $y=ax+b$

结果计算

(1) 按样本质量计算:

$$ORAC(\mu\text{mol GAE/g})=(AUC \text{ 样本}-b) \div a \times V \div W \times n$$

(2) 按细菌或细胞数量计算:

$$ORAC(\mu\text{mol GAE}/10^4)=(AUC \text{ 样本}-b) \div a \times V \div N \times n$$

(3) 按样本体积计算:

$$ORAC(\mu\text{mol GAE/L})=(AUC \text{ 样本}-b) \div a \times V \times n$$

W: 样本鲜重, g;

V:提取体积, 0.001L;

n: 样本稀释倍数;

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

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。