

氧基抗氧化能力ORAC检测试剂盒

规格：微量法 96样

编号：JLC_K14846

检测原理：荧光法

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。

试剂的组成和配制

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250μL	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 μ 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 μ mol/L

测定操作表

	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	190	190	190
混匀, 37°C 孵育 30min			
试剂二 (μL)	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。

结果计算

ORAC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

$$AUC = (RFU_0 + RFU_5 + RFU_{10} + RFU_{15} + RFU_{20} + RFU_{25} + RFU_{30} + RFU_{35} + RFU_{40} + RFU_{45} + RFU_{50} + RFU_{55} + RFU_{60}) / RFU_0$$

RFU_x=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(μmol/L)为x轴, 净AUC为y轴, 绘制标准曲线。

(1) 按样本质量计算:

$$ORAC(\mu\text{mol TE/g}) = y \div W \div 1000 \times n$$

(2) 按细菌或细胞数量计算:

$$ORAC(\mu\text{mol TE}/10^4) = y \div N \div 1000 \times n$$

(3) 按样本体积计算：

$$\text{ORAC}(\mu\text{mol TE/L})=y \times n$$

W: 样本鲜重, g; 1000: 1 $\mu\text{mol/mL}$ =1000 μM ; 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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。