

羟基抗氧化能力HORAC检测试剂盒(荧光法)

规格：微量法 96样

编号：JLC_K14852

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

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。

试剂清单

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°C,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°C,避光	没食子酸（临用前称取1.7271mg加10mL提取液充分溶解即为1000μmol/L）现用现配，不可保存。

样品处理（按照步骤依次操作）

(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°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°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°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°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°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°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°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、将标准品没食子酸 (1000 μ mol/L)用提取液稀释到10,30,50,70,100,200,300,400,500 μ 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 (μ L)	-	10	-
标准品 (μ L)	-	-	10
提取液 (μ L)	10	-	-
试剂一	170	170	170
混匀，37°C 孵育30min			
试剂二 (μ L)	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°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

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

RFU₀=0 min 的相对荧光值。

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：Net AUC=AUC(样本)-AUC(空白)。

3. 标准曲线的绘制：以标准品浓度(μ 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：

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

(2) 按细菌或细胞数量计算：

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

(3) 按样本体积计算：

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

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。