



## 羟基抗氧化能力 HORAC(荧光法)检测试剂盒

规格：微量法 96 样

检测原理：荧光法

编号：TW56841

### 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°C	
试剂一	液体 500μL	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



				试剂一分装冻存避免反复冻融。
试剂二	液体 500 $\mu$ L	x1	-20 $^{\circ}$ C,避光	临用前取出 243 $\mu$ L 与 757 $\mu$ L 蒸馏水充分混匀，现用现配，不可保存。
试剂三	粉剂	X2	-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C,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 1000 $\mu$ mol/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×g，4℃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 ×g，4℃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×g，4℃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℃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 (1000μmol/L)用提取液稀释到 10,30,50,70,100,200,300,400,500μmol/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。

试剂名称(μL)	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℃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°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  $5 \times 10^6$ ,  $N=500$ )。



## 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。