
总氧自由基清除能力(ORAC)测试试剂盒

一、测定原理

ORAC 法(oxygen radical absorbance capacity, 氧自由基吸收能力)是由 Cao 等在 Glazer 研究的基础上发展起来的抗氧化能力的测定方法。它具有生物相关性强, 可以通过改变自由基和反应体系的溶剂测定脂溶性和水溶性物质的抗氧化活性, 方法的专一性强等优点(赵建等, 2011), 因而近年在研究领域广泛应用。

该方法以偶氮类化合物作为自由基来源, 荧光素钠作为指示剂, 水溶性维生素 E (Trolox) 为标准物质进行抗氧化分析。氧自由基通过氢原子转移 (HAT) 过程使荧光探针氧化, 并随着时间的推移淬灭荧光探针(Huanget al., 2015)。分析中存在的抗氧化剂可阻止荧光探针氧化, 推迟荧光的淬灭, 直至样品中的抗氧化剂活性耗尽。因此可以通过荧光衰减的曲线来计算抗氧化物质的氧自由基清除能力: 样品的氧自由基清除能力越强, 荧光素钠的淬灭越慢, 则荧光强度曲线下面积(AUC)越大。

二、试剂及耗材组成

稀释液: 100 mL×1 瓶

试剂一: 荧光素钠 100 μ L ×1 支

试剂二: 自由基引发剂 粉剂 ×1 支

阳性对照: 1mM Trolox 标准溶液 1mL×1 支 (乙醇配制)

黑色荧光酶标板 ×1 片

试剂一配制瓶 ×1 个

加样槽 ×1 个

三、储存条件及有效期

试剂盒-20 $^{\circ}$ C可保存 6 个月。

四、试剂的配制

试剂一应用液: 将试剂一小心转入 10mL 稀释液中, 采用试剂一配制瓶配制, 现配现用。

试剂二应用液: 在试剂二瓶内加入 15mL 稀释液, 冰上配制, 现配现用。

Trolox 标准溶液: 首先将 1mM Trolox 标准溶液使用稀释液¹按照 1: 25 稀释成 40 μ M 溶液(最终体系为 200 μ L, 样品/trolox 添加量为 50 μ L, 因此 40 μ M trolox 的体系终浓度为 10 μ M)。

稀释方法：取 1mM Trolox 标准溶液 400 μ L，加入 9.6mL 稀释液，充分摇匀，得到终浓度为 10 μ M Trolox 溶液 10mL（实际浓度为 40 μ M）。

按照下表稀释得到不同浓度的 Trolox 标准溶液²：

序号	终浓度 10 μ M Trolox 溶液添加量 (μ L)	稀释液添加量 (μ L)	Trolox 终浓度 (μ M)
1	0	1000	0
2	25	975	0.25
3	50	950	0.5
4	75	925	0.75
5	100	900	1
6	150	850	1.5

¹ 稀释液一般应该与样品稀释液保持一致，水溶性样品可直接采用本试剂盒提供的稀释液，脂溶性样品需自备稀释液；

² 标准曲线不是必需步骤，但是推荐制作。表中给出的浓度为建议值，您也可以根据自己样品的抗氧化能力适当调整标准曲线范围。

五、 操作步骤

直接在黑色荧光酶标板按照下表加样：

试剂	加样量 (μ L)
样品溶液（或 Trolox 标准溶液）	50
试剂一应用液	50

充分混匀，37 $^{\circ}$ C 避光静置 30min

试剂	加样量 (μ L)
试剂二应用液 ¹	100

充分混匀²，立即采用酶标仪进行测定，酶标仪设定参数如下：

振荡时间： 5s（可选）

孵育温度： 37 $^{\circ}$ C；

激发波长： 485 \pm 20nm；

发射波长： 520 \pm 20nm；

读取方式³： 1-5min 读取 1 次，连续读取 60 - 90 min

¹ 迅速加入，建议使用多道移液器快速加入；

² 如酶标仪具备振荡功能，建议使用酶标仪振荡以节约时间；

³ 至少反应 60min，2min 读取一次数据；也可将读取时间延长至 90min。

六、计算方法

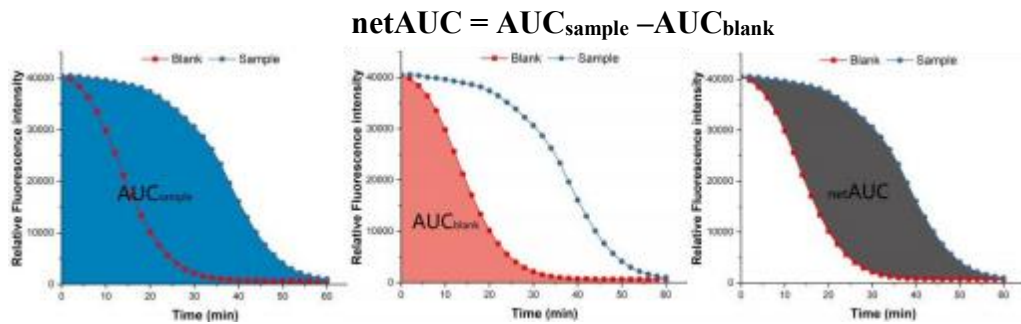
1. 计算曲线下面积(AUC)

将读取得到的初始荧光值(即开始检测后第一次读取的荧光值)记为 F0，第 n 次检测读取得到的荧光值记为 Fn，则采用微积分的思路，AUC 可由如下公式计算：

$$AUC = F0/F0 + F1/F0 + F2/F0 + \dots + Fn/F0$$

2. 计算净曲线下面积 (netAUC)

如下图所示，首先如上述计算不加任何抗氧化剂的孔（空白）的 AUC，得到空白 AUC (AUC_{blank})，将样品（标准品） AUC_{sample} 值减去 AUC_{blank}，即为净曲线下面积 (netAUC)。

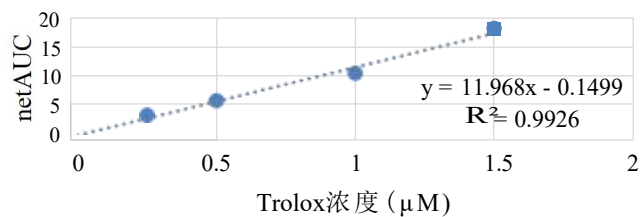


3. 制作标准曲线

将各浓度 Trolox 计算得到的 netAUC 线性拟合成为标准曲线。

例如：计算得到 netAUC 和标准曲线如下：

Trolox 浓度(μM)	netAUC
0	0
0.25	3.00
0.5	5.94
1	10.77
1.5	18.44



4. 通过标准曲线计算样品等价的 Trolox 当量

如计算得到样品溶液 netAUC 值为 6.66，根据标准曲线计算可知，该样品溶液与 0.57 μM TE 的 netAUC 相等，则该样本溶液 ORAC 值为 0.57 μM TE (Trolox equivalent)。如已知样本溶液的浓度为 100 μg/mL，则可进一步计算该样品的 Trolox 当量为 5.7 μmol TE/g。

七、注意事项

1. 本试验需要使用到具有荧光功能的酶标仪，建议使用同时具备荧光测定、孵育、振摇和酶促动力学读取功能的酶标仪。请在试验前确定实验室具备此测定条件，且在试验前先行了解测试程序的设置；
2. 请事先准备好多道移液器（排枪）；
3. 建议先将样品梯度稀释后进行预试验，不在标准曲线的线性范围内会造成较大误差；
4. 试剂二应用液建议在加入试剂一应用液后的等待时间内配制，以尽可能现配现用。同时，试剂二请务必迅速加入，尽可能保证各孔加样时间一致，以减小系统误差(Mellado-Ortega et al., 2017)。
5. netAUC 可不计算，只是标准曲线不过原点，但不影响结果准确性。本说明书中给出的计算方法是较为简单的一种，也可参考相应论文中较为严谨的计算公式。
6. ORAC 测试的样品既可为脂溶性，也可为水溶性。脂溶性样品处理更为复杂，因此更推荐采用亲水溶剂制备样品。如您对样品前处理有疑惑，请向我公司技术支持咨询。