

# 氧基抗氧化能力（ORAC）检测试剂盒（荧光法）

产品货号：BA3427

产品规格：48T/48S；96T/96S

## 背景与原理：

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。

本试剂盒检测原理是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。

## 包装清单：

试剂名称	48T	96T	保存条件
Assay Buffer (2×)	50mL	100mL	2-8°C
Reagent I(100×)	110μL	220μL	-20°C，避光
Reagent II(0.08g)	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20°C，避光
Trolox Standard (5mM)	0.5mL	1mL	-20°C，避光

\*请在实验前检查各组分的量。

\*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

## 所需的仪器和用品：

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光酶标仪	能测激发波长为485nm，发射波长为525nm的吸光度
耗材	96孔酶标板	全黑96孔板
试剂	PBS (pH7.4)、丙酮	提取或稀释样本/Standard用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

## 注意事项：

正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

1. 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
2. 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
3. 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

## 实验流程：

### 一、试剂准备

1. 试剂准备



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer (1×)	临用前, Assay Buffer (2×)用去离子水稀释成1×Assay Buffer, 充分混匀	4°C保存
Reagent I(100×)	临用前, Reagent I(100×)用1×Assay Buffer 稀释成1×Reagent I, 充分混匀, 现配现用	Reagent I(100×)避光分装保存于-20°C 1个月, 避免反复冻融。不要储存稀释的1×Reagent I溶液。有一定毒性, 做好防护。
Working Reagent II	临用前, 根据实验用量, 每19mg加入1mL1×Assay Buffer配制成19mg/mL Working Reagent II。该溶液不稳定, 现配现用	实验过程中避光放置; -20°C避光保存。有一定毒性, 做好防护。
Trolox Standard (5mM)	使用前平衡到室温	实验过程中避光放置; 分装后-20°C避光保存, 避免反复冻融。

## 2. 标准品配制

标准曲线设置: 取 20 $\mu$ L Trolox Standard (5mM)用 480 $\mu$ L 1×Assay Buffer 稀释为 0.2mM Trolox Standard。用 0.2 mM Trolox Standard 按下表所示, 进行下一步稀释。标准品现配现用; 稀释后的标准溶液不稳定, 必须在 4 小时内使用。

Standard 工作液	0.2 mM Standard ( $\mu$ L)	1×Assay Buffer ( $\mu$ L)	浓度 ( $\mu$ M)
1	50	150	50
2	40	160	40
3	30	170	30
4	20	180	20
5	10	190	10
6	5	195	5
7	2.5	197.5	2.5
空白	0	200	0

## 二、样本制备

**注意: 样本以新鲜为宜, 若不能立刻检测, 应储存在-80°C保存。**

1. 动物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL1×Assay Buffer, 冰浴匀浆, 10000g, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。
2. 植物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL1×Assay Buffer 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. 细胞或细菌样本: 收集  $5 \times 10^6$  个细胞或细菌, 用冷的 PBS 清洗细胞或细菌, 800g 离心 2min 后弃上清, 加入 1mL1×Assay Buffer, 冰浴超声波破碎 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。
4. 血清(浆): 用 1×Assay Buffer 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 1×Assay Buffer 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 30-60min 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。

## 三、实验步骤

1. 酶标仪准备: 荧光酶标仪预热到 37°C, 激发波长为 485nm, 发射波长为 525nm。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

2. 检测体系配制：在全黑 96 孔板中按照如下方式操作，标准孔和空白孔一般只做 1 次。空白孔的最终测定值应小于初始值的 10%。

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)
1×Assay Buffer	25	0	0
Standard	0	25	0
上清	0	0	25
1×Reagent I	150	150	150
混匀，37°C 孵育 30min			
Working Reagent II	25	25	25

3. 混匀，立即用荧光酶标仪读取荧光值，每 5min 读取 1 次，总共 60min。荧光酶标仪的测定条件为激发波长为 485nm，发射波长为 525nm，仪器温度保持在 37°C。

## 结果计算

### 样本 ORAC 计算

ORAC 值根据荧光衰减曲线下净面积(AreaUndertheCurve,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

$$AUC=1+RFU_1/RFU_0+RFU_2/RFU_0+RFU_3/RFU_0+\dots+RFU_{59}/RFU_0+RFU_{60}/RFU_0$$

RFU<sub>0</sub>=0 min 的相对荧光值。

RFU<sub>x</sub>=x min 的相对荧光值。(例如，RFU 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：以标准品浓度为 y 轴，净 AUC 为 x 轴，绘制标准曲线。  
 4. 将样本的 NetAUC 带入方程得到 y 值 (μM)，以微摩尔每升 Trolox 当量 (TE) 或每克样品的 TE (μmolTE/g 或 μmolTE/L) 表示 ORAC 值。

- (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：

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

W: 样本鲜重, g; 1000: 1μmol/mL=1000μM; n: 样本稀释倍数; N: 细胞或细菌数量, 以 10<sup>4</sup> 为单位 (例如细胞数量为 5×10<sup>6</sup>, N=500)

## 结果展示

典型标准曲线:  $y=4.9679x-0.916$



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

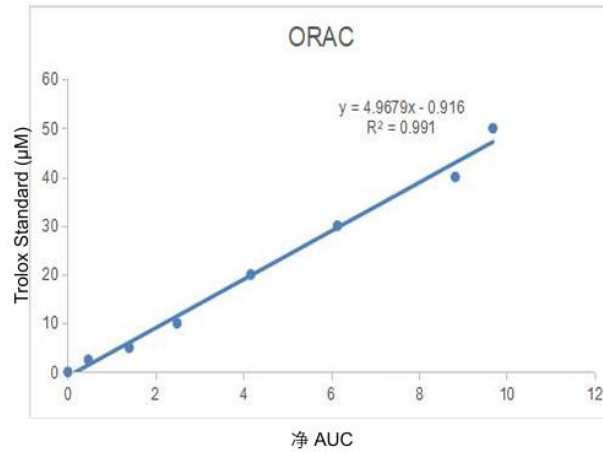
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com



示例-1: 取 0.1 g 动物组织, 按照测定步骤操作, 用全黑 96 孔板进行检测。

测得净 AUC=AUC(样本)-AUC(空白)=6.715-2.820=3.895, 代入标准曲线, Trolox 浓度为 18.43µM, ORAC (µmol TE/g)=18.43µM÷0.1÷1000×50=9.215µmol TE/g。

## FAQ

1. 检测得到的样本ΔA 测定过高或者过低怎么办?

如果样本 NetAUC>10, 需用 1×AssayBuffer 适当稀释 (计算公式中乘以相应稀释倍数)。

如果样本的 NetAUC<0.4, 可提高样本量。

## 保质期:

-20°C, 避光保存 12 个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司  
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com