

## CheKine™ 羟基抗氧化能力 (HORAC) 检测试剂盒 (荧光法)

货号: KTB1502

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

|                                                                                   |                          |                                                                                   |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|  | 检测范围: 1.25-40 $\mu$ M    |  | 灵敏度: 1.25 $\mu$ M |
|  | 适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清 (浆) |                                                                                   |                   |
|  | 保质期: -20℃, 避光保存 12 个月    |                                                                                   |                   |

### 01 背景与原理

羟基抗氧化能力 (Hydroxyl Radical Absorbance Capacity, HORAC) 是一种检测各种样品中生物分子抗氧化能力的方法, 可反映抗氧化剂转移羟自由基的能力。

本试剂盒检测原理是以荧光素钠为荧光探针, 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。

### 02 包装清单

| 试剂盒组分                  | 规格          |             | 储存要求       |
|------------------------|-------------|-------------|------------|
|                        | 48 T        | 96 T        |            |
| Assay Buffer (2×)      | 50 mL       | 100 mL      | 4℃         |
| Reagent I (100×)       | 100 $\mu$ L | 200 $\mu$ L | -20℃, 避光保存 |
| Reagent II (32×)       | 50 $\mu$ L  | 100 $\mu$ L | 4℃, 避光保存   |
| Reagent III            | 1.5 mL      | 3 mL        | -20℃, 避光保存 |
| Trolox Standard (5 mM) | 0.5 mL      | 1 mL        | -20℃, 避光保存 |

\*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。

03 自备仪器与试剂

| 自备资源类型 | 资源名称                                   | 备注                            |
|--------|----------------------------------------|-------------------------------|
| 仪器     | 荧光酶标仪                                  | 激发波长为 485 nm，发射波长为 525 nm     |
| 耗材     | 96 孔酶标板                                | 全黑板                           |
| 试剂     | 去离子水/PBS (pH 7.4)/丙酮                   | 试剂稀释用/样本清洗用/样本处理用             |
| 其他     | 匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、制冰机、<br>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<br>助于提高实验效率 |

04 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。
- 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。
- 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。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

注意：各组分开盖前，请先低速离心。

| 试剂名称                   | 试剂准备                                                                             | 注意事项                                                           |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1× Assay Buffer        | 临用前配制；Assay Buffer (2×)用去离子水稀释成 1×Assay Buffer，充分混匀待用                            | 4℃保存                                                           |
| 1× Reagent I           | 临用前配制；Reagent I (100×)用 1×Assay Buffer 稀释成 1×Reagent I，充分混匀待用                    | 用不完的 Reagent I (100×)在-20℃避光分装保存，避免反复冻融。不要储存稀释的 1×Reagent I 溶液 |
| 1× Reagent II          | 临用前配制；Reagent II (32×)用去离子水稀释成 1×Reagent II，充分溶解待用                               | 4℃避光保存；Reagent II 有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护                       |
| Reagent III            | 即用型；使用前平衡到室温                                                                     | 4℃保存                                                           |
| 0.1 mM Trolox Standard | 临用前配制；取 5 μl Trolox Standard (5 mM) 用 245 μl 1×Assay Buffer 稀释成 0.1 mM 浓度，充分混匀待用 | 用不完的 Trolox Standard (5 mM) -20℃避光分装保存，避免反复冻融                  |

05-1-2 标准品配制

使用 0.1 mM Trolox Standard，按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

| 序号 | 0.1 mM 标准品 (μL) | 1×Assay Buffer (μL) | 浓度 (μM) |
|----|-----------------|---------------------|---------|
| 1  | 80              | 120                 | 40      |
| 2  | 40              | 160                 | 20      |
| 3  | 20              | 180                 | 10      |
| 4  | 10              | 190                 | 5       |
| 5  | 5               | 195                 | 2.5     |
| 6  | 2.5             | 197.5               | 1.25    |
| 7  | 0               | 200                 | 0       |

05-2 样本制备

注意：注意：样本以新鲜为宜，若不能立刻检测，应储存在-80℃保存 1 个月。该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1501 的测定。

- 动物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 1×Assay Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 1×Assay Buffer 捣碎，冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 细胞或细菌样本：收集 5×10<sup>6</sup> 个细胞或细菌，用冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min 后弃上清，加入 1 mL 1×Assay Buffer，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 血清（浆）：用 1×Assay Buffer 稀释 10 倍或更多进行检测。
- 液体样本：10000 g，4℃离心 10 min，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。
- 亲脂性样本：溶于 100%丙酮中，用 50%丙酮稀释，在室温下孵育 1 h，10000 g，4℃离心 10 min，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。
- 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 10 min，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 30-60 min 来进一步提取。10000 g，4℃离心 10 min，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 HORAC 值。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：荧光酶标仪预热到 37℃，激发波长为 485 nm，发射波长为 525 nm。
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  | 20       | 0        | 0        |
| Standard        | 0        | 20       | 0        |
| 上清              | 0        | 0        | 20       |
| 1×Reagent I     | 140      | 140      | 140      |
| 混匀，37℃孵育 30 min |          |          |          |
| 1×Reagent II    | 20       | 20       | 20       |
| Reagent III     | 20       | 20       | 20       |

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

## 06 结果计算

### 06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



### 06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

#### 1. 数据处理

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。

- 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<sub>5</sub>是 5 min 时的相对荧光值）。

- 计算净 AUC：净 AUC=AUC(样本)-AUC(空白)。

#### 2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，净 AUC 为 x 轴，绘制标准曲线。将样本的净 AUC 带入方程得到 y 值 (μM)，以微摩尔每克样品/每 10<sup>4</sup> 个细菌或细胞/每升的 Trolox 当量 (TE) (μmol TE/g 或 μmol TE/10<sup>4</sup> 或 μmol TE/L) 表示 HORAC 值。

#### 3. 样本 HORAC 计算

- 按样本质量计算：

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

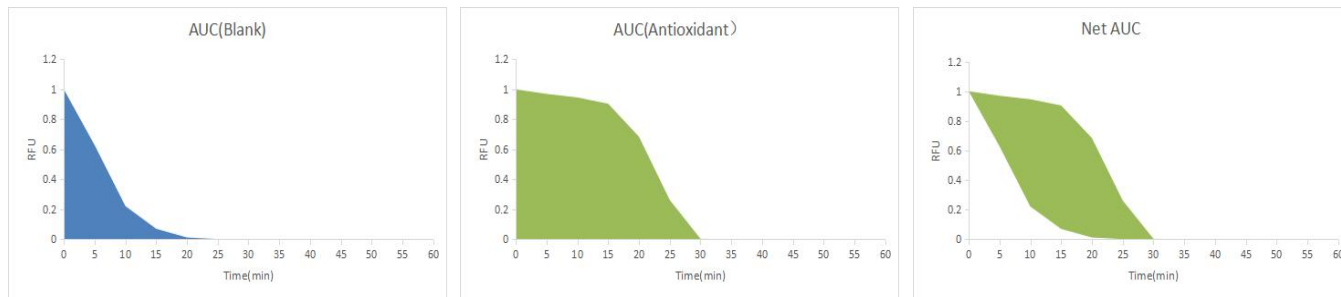
- 按细菌或细胞数量计算：

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

- 按样本体积计算：

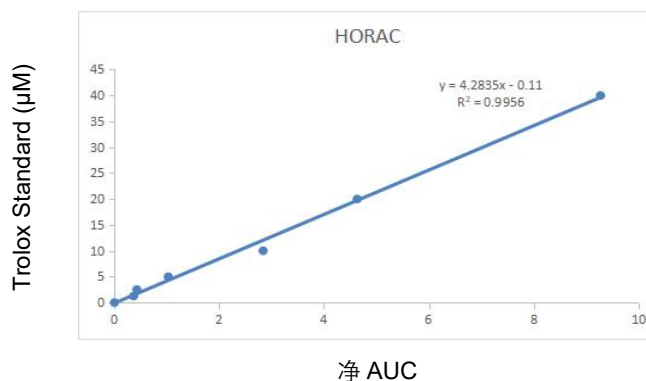
$$HORAC (\mu\text{mol TE/L}) = y \times n$$

W：样本鲜重，g；1000：1 μmol/mL=1000 μM；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）。



## 07 结果展示

典型标准曲线： $y=4.2835x-0.11$ ， $R^2=0.9956$



示例-1: 取 0.1 g 植物组织加入 1 mL 1×Assay Buffer 进行匀浆研磨，取上清，之后按照测定步骤操作，用全黑 96 孔板测得：

样本的 AUC 为 9.199，空白的 AUC 为 1.937，净 AUC=AUC(样本)-AUC(空白)=9.199-1.937=7.262，标准曲线为  $y=4.2835x-0.11$ ，Trolox 浓度为 30.997  $\mu\text{M}$ ，HORAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ )= $y \div W \div 1000 \times n=0.31 \mu\text{mol TE/g}$ 。

## 08 FAQ

### ● 检测得到的样本 Net AUC 过高或者过低怎么办？

如果样本 Net AUC>10，需用 1×Assay Buffer 适当稀释（计算公式中乘以相应稀释倍数）。如果样本的 Net AUC < 0.4，可提高样本量。

## 09 相关产品

| 货号      | 试剂盒名称                            |
|---------|----------------------------------|
| KTB1501 | CheKine™ 氧基抗氧化能力（ORAC）检测试剂盒（荧光法） |
| KTB1500 | CheKine™ 总抗氧化能力（TAC）检测试剂盒        |
| KTB1030 | CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活力检测试剂盒     |

# CheKine™ 羟基抗氧化能力 (HORAC) 检测流程示意图

(Abbkin 货号: KTB1502)

