APPLICATION NOTE

利用 Molecular Devices 微孔板读板机对细胞内氧化自由基吸收能力 (ORAC) 进行分析

引言

活性氧簇 (Reactive oxygen species，ROS) 是由细胞内正常代谢反应，环境压力以及紫外辐射产生的一类物质，包括过氧自由基、羟基自由基、超氧离子和单线态氧。氧化自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity，ORAC) 分析是一种用来评估生理液、食品、饮料以及天然产物抗氧化能力的标准方法，它可以定量检测样品清除自由基的能力。通常自由基能够与细胞内组分发生反应，破坏正常组织，引起基因突变，破坏细胞周期正常运转，导致癌症和其他疾病。

这里我们展示的是如何利用 Molecular Devices 荧光微孔板读板机 Gemini™ XPS 及SoftMax Pro 软件联合 Cell Biolabs 的 OxiSelect™ ORAC Assay 来检测不同果汁的抗氧化能力，并突出了该方法简单易行的特点。

检测原理

该检测是基于由偶氮二异丁脒盐酸盐 (2, 2'-azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride，AAPH) 热解产生的过氧自由基，在氧自由基吸收物质存在的条件下与荧光素反应，从而影响荧光信号强度这一原理的。氧自由基吸收物质的能力越强，清除的过氧自由基也就越多，荧光信号持续的时间也就越长。为了获得待测样品的抗氧化能力，可在荧光强度对时间作图的曲线中，计算样品曲线下方的 区域面积，并扣除空白样品曲线下方的区域面积得到结果。最终结果以一种维生素E的类似物 Trolox™ 的抗氧化能力表示。

材料

- Cell Biolabs OxiSelect ORAC Assay 试剂盒，Part No. STA-345
- MD 荧光微孔板读板机 Gemini™ XPS
- Greiner FLUOTRAC™ 200 全黑微孔板
- 待测样品：白蔓越橘汁，白葡萄汁，橙汁，石榴汁，蓝莓汁，红酒

方法

以下步骤根据 Cell Biolabs OxiSelect ORAC Assay 试剂盒中的操作流程建立。

试剂制备

荧光素探针制备：将试剂盒中所提供的荧光素探针用所提供的分析稀释液稀释 100 倍，混匀后标记为 1×荧光素工作液。

分析稀释液制备：分析稀释液按 1:4 的比列用去离子水稀释混匀，稀释后的液体可为所有样品和标准品稀释所用，4°C保存。

样品制备：果汁和红酒样品预先 4°C 离心 10 分钟 (5-10,000 x g) 去除颗粒，随后上清在分析检测前稀释 100 到 1000 倍。

抗氧化剂标准曲线绘制

所需标准品浓度可通过稀释 1000 µM 的抗氧化剂标准品储液来获得，现配现用。浓度梯度稀释关系如表 1 所示，零浓度 Trolox 标准品可作为空白对照。

注：每个标准品和待测样品均需要准备 2 或 3 个复孔用于分析。每次分析都需要新鲜配制标准品。

分析步骤

1. 25 μL 抗氧化剂标准品和样品加入 96 孔板中，每个样品 2 个复孔。
2. 每孔加入 150 μL 1×荧光素工作液，微孔板充分混匀后放入预热的微孔板读板机中 37°C 孵育 30 分钟。
3. 用多道移液器移取 25 μL 自由基起始液至每孔中。
4. 加入自由基起始液后立即震板 15 秒以便混匀液体。微孔板在读板前需在仪器上震板 5 秒。
5. 利用 Molecular Devices 荧光微孔读板机 Gemini™ XPS 读取每孔的动力学荧光信号。在 SoftMax Pro 软件中激发光波长设为 485 nm，发射光波长设为 520 nm，cutoff 设为 515 nm。微孔板一次整板读取时间为 1 分钟，总共持续 60 分钟。

注：到分析结束时，最终荧光信号强度应小于初始荧光强度的 10%，否则应提高样品的稀释倍数重新检测。

结果计算

1. 利用 SoftMax Pro 软件计算每个样品和标准品的曲线下方区域面积 (Area under the curve，AUC)。
2. 每个样品和标准品的净 AUC 应当通过扣除空白对照的 AUC 获得。
3. 以净 AUC 值为纵轴，Trolox 抗氧化剂标准品浓度为横轴作图。
4. 待测样品的 Trolox 浓度当量 (TE，单位 μM) 可根据标准曲线计算获得，结果用 μM TE/mL 表示。

结果

标准曲线绘制及数据分析均采用 SoftMax Pro 软件处理。Trolox 标准品的动力学曲线如图 1 所示。每个标准品的净 AUC 通过扣除空白对照的 AUC 获得。图 2 显示的是每个 Trolox 标准品的净 AUC 对浓度作图获得的标准曲线。所有样品都需要计算净 AUC。从 Trolox 标准曲线算出每个样品的 ORAC 值——以 Trolox 浓度当量 (TE，单位 μM) 表示，并乘以各自的稀释倍数算出最终 ORAC 值，单位 μMTE/mL。稀释 100 倍的样品的信号值超出标准曲线范围，稀释 1000 倍的样品的信号值在标准曲线范围内，其 ORAC 值如表 2 所示。待测样品中红酒的 ORAC 值最高，而的白蔓越橘汁 ORAC 值最低。需要注意的是来自不同制造商生产出的产品的组分可能不同，会引起样品 ORAC 值的不同。

Tubes	Trolox Antioxidant Standard (μL)	Assay Diluent (μL)	Trolox Concentration (μM)
1	50	950	50
2	40	960	40
3	30	970	30
4	20	980	20
5	10	990	10
6	5	995	5
7	2.5	997.5	2.5
8	0	1000	0

表1. Preparation of Standards

Kinetic curves for different Trolox concentrations

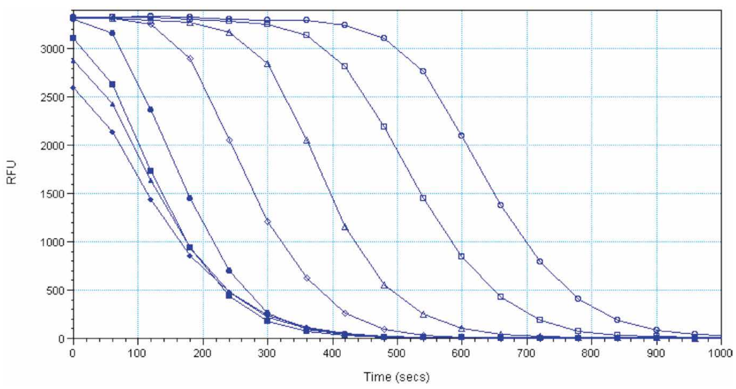

图 1　Trolox 标准品的动力学曲线浓度范围从 2.5 到 50 μM，根据动力学曲线可计算 AUC

总结

利用 Molecular Devices 荧光微孔读板机 Gemini™ XPS 可以方便地进行 Cell Biolabs 的 OxiSelect™ ORAC 分析，同时仪器配套的 SoftMax Pro 软件可以自动计算结果并完成标准曲线绘制。

需要注意的是 Molecular Devices 其他多功能微孔板读板机如 （SpectraMax M2、M2e、M3、M4、M5、M5e、Paradigm®）以及 FilterMax™ F5 都能够提供荧光检测模式，且都可以进行OxiSelect ORAC 分析。FlexStation® 3 台式多功能微孔读板机还能够进行自动化加样。

StakMax® 微孔板堆板机可与 SpectraMax Gemini 系列以及 M 系列微孔读板机整合使用以提高通量。

References

1. Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53, 1841-1856.
2. Wang, H., Cao, G., and Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem. 44, 701-705.

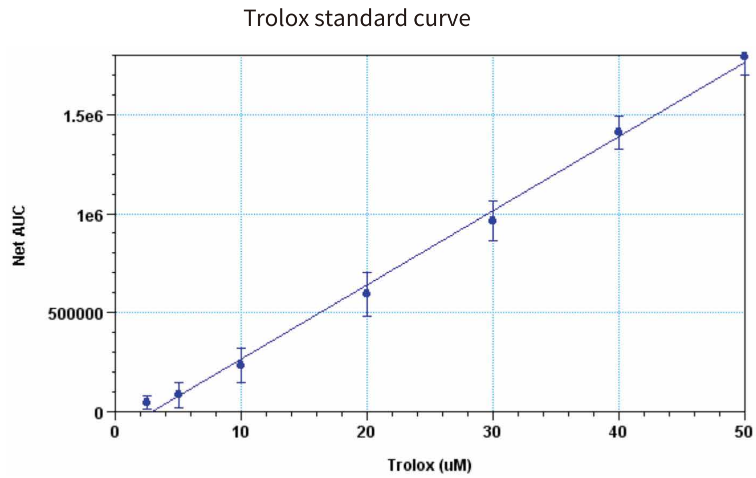

图 2 根据上述方法通过计算每个标准品的净 AUC 获得 Trolox 的标准曲线，标准曲线 R2=0.996

Sample	ORAC Values (μmol TE/mL)
White cranberry juice	15.7
White grape juice	21.6
Orange juice	19.0
Pomegranate juice	25.0
Cranberry-blueberry juice	22.8
Red wine	29.3

表 2. ORAC values for fruit juice and wine samples

更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线：400-820-3586 www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

上海 电话：86-21-3372 1088 传真：86-21-3372 1066 地址：上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

北京 电话：86-10-6410 8669 传真：86-10-6410 8601 地址：北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

成都 电话：86-28-6558 8820 传真：86-28-6558 8831 地址：成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

台北 电话：886-2-2656 7585 传真：886-2-2894 8267 地址：台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

香港 传真：852-2289 5385 地址：香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼