

超氧阴离子（OFR）含量检测试剂盒

（货号：SH3009 酶标法 96T）

一、产品简介

超氧阴离子（Oxygen Free Radical, OFR）是生物体内最常见的活性氧之一，在信号传导、免疫防御等生理过程中发挥重要作用。当生物体遭受外界胁迫时，体内代谢失衡会导致超氧阴离子等活性氧爆发性积累。通过准确测定其含量，不仅可以量化氧化和细胞损伤的严重程度，还能直观反映生物体自身抗氧化防御系统的激活状态与清除效率等特性。

二、检测原理

超氧阴离子在酸性条件下能将羟胺氧化为亚硝酸根离子（ NO_2^- ）。生成的 NO_2^- 在酸性介质中与对氨基苯磺酸和 α -萘胺反应，生成粉红色的偶氮染料。该产物在 540 nm 波长处有特征吸收峰，在特定浓度范围内，吸光度值与超氧阴离子的含量成正比。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	临用前，可依据待测样本数量，把试剂二和试剂三等体积混合成无色的反应 mix（注意观察，若变粉色，则不能使用）。两天之内用完。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体×1 支	4℃保存	若需要做标曲，则用到该试剂

四、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器、冰、蒸馏水。

五、超氧阴离子（OFR）含量测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

①组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，在 4℃ 12000g 离心 10min，取上清待测。

【注】若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：



5~10 的比例进行提取；提取液尽快测定，请勿将样品长时间低温保存，以免影响测定结果。

②细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，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 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃离心 10min，取上清待测。

③液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

②在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	100	
提取液		100
试剂一	100	100
混匀，37℃反应 10min		
反应 mix	200	200
混匀，37℃反应 5min（准确时间）后，立即取出 200 μ L 至 96 孔板中（若浑浊可于 8000g 室温下离心 5min 后取 200 μ L 上清液），在 540nm 处测吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$		

六、结果计算

1、根据标准曲线，计算 ΔA 对应的亚硝酸钠（ NaNO_2 ）浓度 C（单位为 $\mu\text{mol/L}$ ）。例如本说明书中的标准曲线为 $y = 8.2783x - 0.0006$ ，则 $C = (\Delta A + 0.0006) / 8.2783$ 。

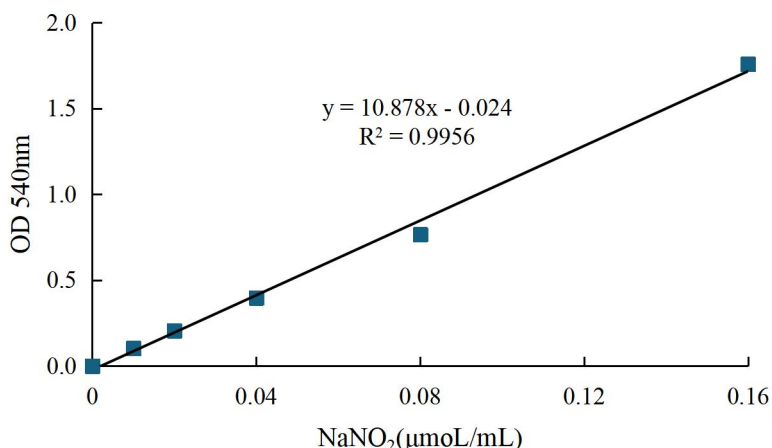


图 1 NaNO₂ 检测试剂盒的标准曲线效果图，图中数据仅供参考。

2、按照样本鲜重计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/g 鲜重)} = C \times V1 \times 10^3 \div (W \times V1 \div V) \times 2 \times D$$

3、按照细菌或细胞数量计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/10}^4\text{cell)} = C \times V1 \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \times 2 \times D$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{超氧阴离子含量(nmol/mL)} = C \times 10^3 \times 2 \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

2---生成一个 NO₂⁻需要两个 O₂⁻

七、标准曲线制作

- 1、制备标准品母液（100μmol/mL）：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2、把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16μmol/mL。也可以根据实际样本来调整校准品浓度。
- 3、依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。