

超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AM0311

产品规格 100T/48 样

产品内容

使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 100 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.25mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：使用前先离心再吹打混匀。根据样本量将试剂二用蒸馏水稀释 10 倍后使用，当天用完。
2. 试剂四：根据样本量将试剂四用蒸馏水稀释 5 倍后使用，当天用完。

产品简介

SOD (EC 1.15.1.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，催化超氧化物阴离子发生歧化作用，生成 H_2O_2 和 O_2 。SOD 不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是 H_2O_2 主要生成酶，在生物抗氧化系统中具有重要作用。

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子(O_2^-)， O_2^- 可还原氮蓝四唑生成蓝色甲臞，后者在 560nm 处有吸收；SOD 可清除 O_2^- ，从而抑制了甲臞的形成；反应液蓝色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、细胞超声破碎仪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理 (可适当调整待测样本量)

1. 细胞、细菌样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎(功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)。8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

2. 组织样本：按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1:5- 10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清(浆)样本：直接检测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂一、三和四 37℃ (哺乳动物)或 25℃ (其它物种)水浴 5min 以上。
3. 样本测定(按顺序在 96 孔板或加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2
样 本	20	20	-	-
试剂一	45	45	45	45
试剂二	20	-	20	-
试剂三	35	35	35	35
蒸馏水	70	90	90	110
试剂四	10	10	10	10

充分混匀，37℃水浴 30min 后，560nm 处测定各管吸光值 A。计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白。如底部有沉淀，混匀后再行测定。(空白管 1 和空白管 2 各只需做 1~2 管；每个样本有一个对照管)

三、SOD 活性计算

1. 抑制百分率的计算

$$\text{抑制百分率} = (\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%$$

尽量使样本的抑制百分率在 30-70%范围内，越靠近 50%越准确。如果计算出来的抑制百分率小于 30%或大于 70%，则通常需要调整加样量后重新测定。如果测定出来的抑制百分率偏高，则需适当稀释样本；如果测定出来的抑制百分率偏低，则需重新准备浓度比较高的待测样本或者提高操作表中样本体积，同时减少相同的蒸馏水体积。

2. SOD 酶活性单位：在上述黄嘌呤氧化酶偶联反应体系中抑制百分率为 50%时，反应体系中的 SOD 酶活力定义为一个酶活力单位。

3. SOD 酶活性计算：

$$\begin{aligned} (1) \text{ 血清(浆) SOD 活性(U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \times F \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F \end{aligned}$$

- (2) 组织、细菌或培养细胞 SOD 活力计算：

- a. 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \times F \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div Cpr \times F \end{aligned}$$

b.按样本质量计算

$$\text{SOD 活性(U/g 质量)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F$$

c.按细菌或细胞数量计算

$$\text{SOD 活力(U/10}^4\text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F = 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 加入反应体系中的样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积 1mL; Cpr: 蛋白样本浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500 : 细胞或细菌总数, 500 万; F : 样本稀释倍数。

实验实例:

1. 取 0.1g 大鼠肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.566 - 0.138 = 0.428$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.802 - 0.041 = 0.761$, 抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 43.8\%$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{SOD 活性(U/g 质量)} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W = 77.94 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取 0.1g 稗草叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清用蒸馏水稀释 4 倍后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.498 - 0.078 = 0.42$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.771 - 0.042 = 0.729$, 抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 42.4\%$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{SOD 活性(U/g 质量)} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 294.4 \text{ U/g 质量}$
3. 取 20μL 羊血清蒸馏水稀释 50 倍后直接按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.467 - 0.049 = 0.418$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.771 - 0.042 = 0.729$, 抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 42.7\%$, 按血清/血浆体积计算酶活得:
 $\text{血清(浆) SOD 活性(U/mL)} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times 50 \text{ (稀释倍数)} = 372.6 \text{ U/mL}$
4. 取 1000 万细胞加入 1mL 提取液, 超声破碎, 离心取上清, 直接按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.52 - 0.058 = 0.462$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.802 - 0.04 = 0.762$, 抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 39.4\%$, 按细胞/细菌数量计算酶活得:
 $\text{SOD 活力(U/10}^4\text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.0065 \text{ U/10}^4\text{ cell}$ 。

注意事项:

1. 样本和试剂二使用时在冰上放置。
2. 样本较多时, 可按表格配制测定管工作液和对照管工作液(包含试剂一、(二)、三、蒸馏水), 试剂四必须最后加入。
3. 反应完成后, 可能有沉淀生成, 混匀后测定即可。