

超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：XZK-W-A500

规格：100T/96S

产品内容：

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂二：粉剂 ×1 支，4℃避光保存；临用前使用20ml试剂一充分溶解，配好的试剂 4℃避光可保存一周。

试剂三：液体 110μL×1 支，4℃保存；临用前将试剂三用蒸馏水稀释 10 倍，用多少配多少。

试剂四：液体 2.5mL×1 瓶，-20℃保存。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

产品说明：

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($O_2^{\cdot-}$)， $O_2^{\cdot-}$ 可与 WST-8 反应产生水溶性染料甲臃，后者在 450nm 处有吸收；SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$ ，从而抑制了甲臃的形成；反应液黄色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。

操作步骤：

一、样品的前处理：

(1) 细菌、细胞或组织样品的制备：

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（生理盐水或者PBS），超声波破碎（功率 20%或 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。

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液（生理盐水或者PBS）进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

(2) 血清(浆)样品：直接检测

二、测定操作表：

- 1 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- 2 测定前将试剂一、二和四 37℃水浴 5min 以上。
- 3 样本测定（按顺序加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管 1	对照管 2	对照管 3
样本	10			
蒸馏水		10	10	10
试剂三 (稀释后)	10	10	10	10
试剂四	20	20	20	20
试剂二	160	160	160	160

充分混匀，室温静置 30min 后，450nm 处测定各管吸光值 A。

注意事项：

- 1、试剂三为酶，不可冷冻，使用时在冰上放置。
- 2、对照管只需要做三管，求平均值。
- 3、SOD 为什么有的样本测定管大于对照管，对照管数值在什么范围？对照管的范围是 0.4-1。对照管吸光值过低可能是：
 - (1) 试剂三活性低，可以适当减少稀释倍数；
 - (2) 没有按顺序加试剂；
 - (3) 反应时间不够，可以延长反应时间（反应时间可以延长到 40min）。
 - (4) 对照管吸光值过高可能是试剂三未按操作说明书稀释相应倍数。
 - (5) 可能是样本中杂质的影响太大，为了降低杂质的影响一般将样本提取上清液用蒸馏水或提取液稀释 10 倍后再测，通常可以使测定正常。计算公式中乘以相应稀释倍数。

SOD 活性计算：

1、抑制百分率的计算

抑制百分率 = $(A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) \div A_{\text{对照管}} \times 100\%$

尽量使样本的抑制百分率在 10-90% 范围内。如果计算出来的抑制百分率小于 10% 或大于 90%，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，则需将样本用提取液适当稀释；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。

2、SOD 酶活性单位：在上述黄嘌呤氧化酶耦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 (U/mL)。

3、SOD 酶活性计算：

血清（浆）SOD 活性 (U/mL) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}}$
 $= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

组织、细菌或培养细胞 SOD 活力计算：

按样本蛋白浓度计算

SOD 活性 (U/mg prot) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}})$
 $= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}}$

需要另外测定，建议使用上海优选生物科技有限公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

按样本鲜重计算

$$\text{SOD 活性(U/g 鲜重)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ = 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W$$

c.按细菌或细胞个数计算

$$\text{SOD 活力(U/104 cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ = 0.04 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；

V 样：加入反应体系中样本体积，0.01mL；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。