

超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒

简介：

SOD 广泛存在于动物、植物、微生物与培养细胞中，催化超氧化物阴离子发生歧化作用，生产 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，超氧阴离子可与 WST-1 反应生成水溶性黄色甲臍，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除超氧阴离子，从而抑制甲臍的形成；反应液黄色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。

试剂盒组分：

试剂名称	规格：48T	保存条件
样本稀释液	液体 30mL × 1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 5mL × 1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 25 μ L × 1 支	2-8℃ 保存
试剂三	液体 4mL × 1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 0.12 mL × 1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：使用前先使用掌上离心机离心至管底再吹打混匀；
- 2、试剂二工作液：根据样本数量按试剂二：蒸馏水 = 5 μ L : 245 μ L（共 250 μ L，约 12S）的比例配制试剂二工作液，现用现配；
- 3、试剂四工作液：根据样本量按试剂四：蒸馏水 = 20 μ L : 180 μ L（共 200 μ L，约 20T）的比例配制试剂四工作液，现用现配。

本试剂盒可用于检测细胞、组织、血浆、血清、红血球、植物等样品。

一、样本处理：

1. 血清样品：将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃ 过夜，然后 1,000 × g 离心 15 分钟，取上清即可，将上清置于 ≤ -20℃ 冷冻保存，避免反复冻融。
2. 血浆样品：用 EDTA 或肝素钠抗凝管采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 4℃ 冰箱，1,000 × g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 ≤ -20℃ 冷冻保存，避免反复冻融。
3. 组织匀浆：
 - A、在预冷 PBS (0.01mol/L, pH=7.0-7.2) 中清洗去除血液，低温切割标本后，准确称取组织重量。
 - B、按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的匀浆介质 PBS。用手工或匀浆器将标本充分匀浆。

C、3000 ×g 离心 15 分钟，仔细收集匀浆上清，弃沉淀，（如需要可取部分进行 BCA 蛋白定量），≤-20℃ 以下保存。

4. 细胞裂解液:在分析试验之前，细胞需利用以下方法处理:

A、贴壁细胞应该用冷 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，于 1,000×g 离心 5 分钟后收集，（悬浮细胞通过离心直接收集），将收集到的细胞用冷 PBS 洗 3 次。

B、用 PBS 稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过超声破碎或反复冻融方式，以使细胞破坏并放出细胞内成份。3000 ×g 离心 15 分钟，仔细收集上清，≤-20℃冷冻保存。

5. 细胞培养上清或其它生物体液标本:请 3,000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于≤-20℃ 冷冻保存，避免反复冻融。

二、检测步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，分光光度计蒸馏水调零。

2. 测定前将试剂一、试剂三和试剂四工作液 37℃水浴 5min 以上。

3. 加样表(按顺序在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

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
试剂二工作液	20	-	20	-
试剂三	35	35	35	35
蒸馏水	70	90	90	110
试剂四工作液	10	10	10	10

充分混匀，37℃水浴 30min 后，450nm 处测定各管吸光值 A。分别记为 A 测定、A 对照、A1 空白、A2 空白， 计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ 。（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、计算方法:

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加样表中的样本量, 但需相应减少测定管和对 照管中蒸馏水的体积。

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:

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

(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

$$\text{SOD 活性 (U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

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

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

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中的样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积 1mL; C_{pr} : 蛋白样本浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; N : 细胞或细菌总数, 以 10^4 计; F : 样本稀释倍数。

注意事项

- 1、样本和试剂二工作液使用时在冰上放置。
- 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、(试剂二工作液)、试剂三、蒸馏水), 试剂四工作液必须最后加入。
- 3、实验之前建议选择 2-3 个样本进行预实验;