

## 组织及血液超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA4-C24	组织及血液超氧化物歧化酶（SOD） 试剂盒	24T	常量法

### 产品说明：

SOD（EC 1.15.1.1）是一种广泛存在于生物体内的金属酶，是重要的氧自由基清除剂，能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。

### 试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 160 $\mu$ L×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 11 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体0.5mL×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=30 $\mu$ L：270 $\mu$ L（共300 $\mu$ L，约5S）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=60 $\mu$ L：240 $\mu$ L（共300 $\mu$ L，约10T）的比例配制试剂四工作液，现用现配。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理

1. 细菌或细胞样本：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200W，超声3s，间隔10s，重复30次），8000g 4℃离心10min，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. 分光光度计预热30min 以上，调节波长至560nm，蒸馏水调零。
2. 临用前根据样本数量取部分试剂一、试剂三和试剂四工作液37℃水浴5min 以上。
3. 样本测定（在EP 管中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管 1	空白管2
样 本	90	90	-	-
试剂一	240	240	240	240
试剂二工作液	60	-	60	-
试剂三	180	180	180	180
蒸馏水	400	460	490	550
试剂四工作液	30	30	30	30

充分混匀，37℃水浴30min 后，置于1mL 玻璃比色皿测定560nm 下的吸光度，分别记为A 测定、A 对照、A1 空白、A2 空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}}=A1_{\text{空白}}-A2_{\text{空白}}$ 。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：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：

$$(1) \text{血清(浆) SOD 活性(U/mL)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \times F = 11.11 \times \frac{\text{抑制百分率}}{(1 - \text{抑制百分率})} \times F$$

(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

$$\text{SOD 活性 (U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times F = 11.11 \times \frac{\text{抑制百分率}}{(1 - \text{抑制百分率})} \div C_{\text{pr}} \times F$$

B.按样本质量计算

$$\text{SOD 活性 (U/g 质量)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F = 11.11 \times \frac{\text{抑制百分率}}{(1 - \text{抑制百分率})} \div W \times F$$

C.按细菌或细胞数量计算

$$\text{SOD 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F = 11.11 \times \frac{\text{抑制百分率}}{(1 - \text{抑制百分率})} \times F \div N$$

V 反总：反应体系总体积，1 mL；V 样：加入反应体系中样本的体积，0.09mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌总数，以万计；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、反应完成后，可能有沉淀生成，混匀后测定即可