

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-M48	组织及血液超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒	48T	微量法

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贖，后者在560nm处有吸收；SOD可清除 O_2^- ，从而抑制了甲贖的形成；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 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 μ L×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 μ L：270 μ L（共300 μ L，约15S）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 μ L：240 μ L（共300 μ L，约30T）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，分光光度计蒸馏水调零。
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（按顺序在 96 孔板或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	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℃反应 30min 后，560nm 处测定各管吸光值 A。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}$ 。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：

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

(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

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

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

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

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；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