

超氧化物歧化酶（SOD）活性测定试剂盒

（货号：SH3002 酶标法 96T）

一、产品简介

超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD, EC 1.15.1.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是生物体内重要的抗氧化酶。SOD能够催化超氧阴离子自由基（ $O_2^{\cdot-}$ ）发生歧化反应，生成 H_2O_2 和 O_2 ，在机体氧化与抗氧化平衡中起关键作用。

二、检测原理

本试剂盒采用 WST-8 显色法：黄嘌呤氧化酶（XO）催化黄嘌呤氧化产生超氧阴离子自由基（ $O_2^{\cdot-}$ ），WST-8 与 $O_2^{\cdot-}$ 反应生成水溶性的橙黄色甲臞产物，该产物在 450 nm 波长处有特征吸收峰。SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$ ，从而抑制甲臞的形成。反应液颜色越深，说明 SOD 活性越低；颜色越浅，说明 SOD 活性越高。通过测定 450 nm 处吸光度的变化，计算 SOD 对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率，即可得出 SOD 酶活性。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 1.1mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 200μL×1 支	4℃保存	若凝固，可在 25℃水浴温育片刻至全部融解，分装后-20℃保存。临用时取 20μL 至一个新 EP 管中，加入 480μL 试剂一稀释待用。

四、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器、冰和蒸馏水。

五、超氧化物歧化酶（SOD）活性测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备:

①组织样本: 称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 在 4°C 12000g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】若增加样本量, 可以按照组织质量(g): 提取液体积(mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

②细菌/细胞样本: 先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 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

③液体样本: 直接检测, 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

②测试前将试剂一、三和四 25°C冰浴 5min 以上。

③用排枪操作, 以减少各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。

④在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	样本管	样本对照管 (可选做)	空白管 1 (仅做一次)	空白管 2 (仅做一次)
试剂一	140	140	140	140
试剂二	10		10	
蒸馏水		10	10	30
样本	20	20		
试剂三	10	10	10	10
试剂四	20	20	20	20
充分混匀, 室温 (25°C) 避光静置 30min (准确时间) 后, 在 450nm 处测定各管吸光值 A				

【注】: 1、若样本数量较多, 测定前可将试剂一、三和四按照 140μL:10μL:20μL 比例混成一个混合液(需依据每次检测的样本数量来混合对应的试剂量), 每孔务必最后一步加 170μL 该混合液。

2、样本对照管: 提取后样本颜色较深: 如棕褐色或黄色, 或 A 对照管值>0.1, 可做此管, 否则抑制率偏低, 即 SOD 活性偏低。若为相同样本可做一组样本对照

管，若每个样本都做对照管，则该试剂盒由原来可测 96 样变为 48 样。

- 3、若样本管数值较低，可能是：①试剂二或试剂四没有现配现用；②没有按顺序加试剂；③反应温度需室温（25℃）。

六、结果计算

1、抑制百分率计算：

$$\text{抑制百分率} = \frac{(A_{\text{空白管1}} - A_{\text{空白管2}}) - (A_{\text{样本管}} - A_{\text{样本对照管}})}{(A_{\text{空白管1}} - A_{\text{空白管2}})} \times 100\%$$

若没有做 A 样本对照管，则值为 0 带入公式计算抑制百分率；控制抑制百分率在 30-80% 范围内。1：若小于 30%，可增加取样质量 W（如增至 0.2g），或增加样本加样体积 V1（如由 20ul 增至 50 或更多，则试剂一相应减少，保存总体积不变）；2：若大于 80%，则需将样本粗提液用蒸馏水或提取液适当稀释。用改变后的 W 和 V1 和稀释倍数 D 带入公式计算。

2、SOD 酶活性计算

SOD 酶活单位：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)。

① 按样本鲜重计算：

$$\text{SOD 活性(U/g 鲜重)} = \frac{[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \times D}{10} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D$$

② 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{SOD 活性(U/mg prot)} = \frac{[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \times D}{10} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div \text{Cpr} \times D$$

③ 按细胞数量计算：

$$\text{SOD 活性(U/10}^4\text{cell)} = \frac{[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \times D}{0.02} = 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D$$

④ 按液体体积计算：

$$\text{SOD 活性(U/mL)} = \frac{[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div V_1 \times D}{10} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/ml，推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒（货号：AR0146）。