超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒说明书(精简版)

（货号：A001-3　WST-1法）

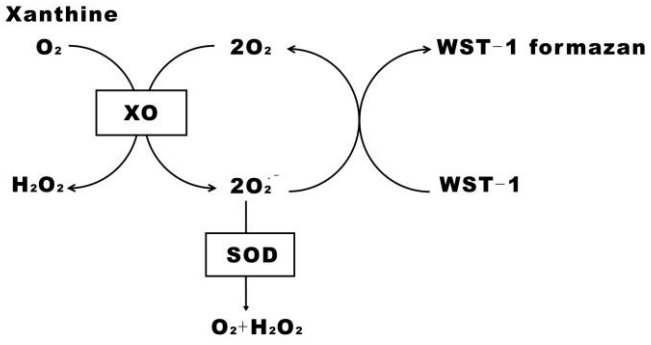
一、试剂组成与配制(试剂盒有效期6个月)

	组　份	A001-3-1：48T	A001-3-2：96T	保 存
试剂一	缓冲液	15mL×1瓶	15mL×2瓶	2～8℃
试剂二	底物贮备液	0.07mL×1支	0.15mL×1支	2～8℃
底物应用液的配制：将试剂二：试剂一按1：200的比例混合，充分混匀，现用现配，用多少配多少。				
试剂三	酶贮备液	0.15mL×1支	0.3mL×1支	-20℃以下
试剂四	酶稀释液	2mL×1瓶	4mL×1瓶	2～8℃
酶工作液的配制：将试剂三：试剂四按1：10的比例混合，充分混匀，现用现配，用多少配多少。				

二、所需仪器

任意规格酶标仪（450±10nm波长）、普通一次性96孔微孔板（附送一块）、微量移液器（单道移液器、多道移液器）、37℃恒温孵育箱（或水浴锅）、普通低速离心机、生理盐水（0.9%）或PBS（0.1M）、涡旋混匀器、蛋白测定试剂（组织及细胞用，本公司有售）。

三、测定原理：



四、测定意义

本试剂盒测定超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）活力，可测血清(浆)、脑脊液、胸水、腹水、肾透析液、尿液、红细胞、白细胞、血小板、心肌培养细胞、肿瘤培养细胞、各种动植物组织细胞及亚细胞水平（线粒体、微粒体）中的SOD活力，并可检测微生物、药物、食品、饮料、化妆品中的SOD活力。

五、主要技术性能参数

1、对照孔OD≥0.2

2、反应温度：37℃　　波长=450nm（±10nm）

3、批内CV=5.05%　　批间CV=3.32%

4、检出限：0.5U/mL

六、注意事项

1、请用多道移液器来加底物应用液以缩短时间，减少各孔间的误差。

2、用96孔板操作时，轻轻震荡孔板，保证样本与试剂的充分接触。

3、正式检测之前，请挑取2例(正常组+实验组各一个)样本，稀释成不同浓度进行预实验，选取抑制率在40%-60%的这一孔对应的样本浓度，进行正式批量试验。

4、此方法特异性强，专一性测定SOD，能排除一些类SOD的干扰。

5、此法抑制率可达100%。

6、对照孔、对照空白孔一批实验只需各做1-3孔,测定空白孔视情况而定(样本有颜色或有浊度等时需要单独做,样本间物理性状差异不大时可以随机挑选1-3个样本做)，但是做预试时同一样本的不同浓度最好都做相应的测定空白孔。

七、操作步骤：

1、样本前处理：

⑴、**血清（浆）样本：**观察血清（浆），如有浑浊需3500转/分左右，离心10分钟，取上清待用，如无则直接使用（直接选取2例进行预实验确定最佳上样浓度）。

（注意：全血抗凝时不宜用EDTA，推荐用肝素钠）

⑵、**动物组织样本：**准确称取组织重量，按照重量（g）：体积(mL)=1 :9的比例加入9倍体积生理盐水，剪碎组织，冰水浴制备匀浆，2500～4000转/分钟，离心10分钟，取上清即10%匀浆上清液待测（匀浆上清选取2例进行预实验确定最佳上样浓度，另外还需要测定其蛋白浓度（蛋白浓度可用本公司的BCA或考马斯亮蓝试剂盒测定），用于计算）。

⑶、**细胞样本：**①、**收集细胞：**如果是悬浮培养的细胞，可直接通过离心收集沉淀细胞（1000 转/分，离心 10 分钟，弃上清留沉淀细胞）；如果是贴壁培养的细胞，吸去上清，可通过细胞刮直接将细胞刮下，或者是用 0.25%的胰酶室温消化 2～3 分钟，加培养液终止消化，用微量移液器轻轻吹打，将所有液体吸出转入 EP 管，然后 1000 转/分，离心 10 分钟弃上清，留沉淀细胞，再加入 1mL PBS 轻轻吹打，再次 1000 转/分，离心 10 分钟弃上清，留沉淀细胞待用。如暂时不做，则可以将细胞低温冻存，温度越低越好。

②、**细胞破碎：第一种方法是研磨破碎（**在细胞沉淀中加入一定量（10^6 数量级的细胞一般加 0.3～0.5mL）的缓冲液（缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水），用手动玻璃匀浆器冰水浴研磨 3～5 分钟，或者是用卡富隆电动研磨器冰水浴研磨 3 分钟）；**第二种方法是超声破碎（**在细胞沉淀中加入一定量（10^6 数量级的细胞一般加 0.3～0.5mL）的缓冲液（缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水），需保证超声探头在液面以下。功率 300W，冰水浴，每 3～5S 超声一次，间隔 4 次（每次间隔时间为 30S 左右））**（推荐此法）**；**第三种方法反复冻融（**可以用液氮进行反复冻融，让细胞在 EP 管或者是冻存管中加入一定量的低渗液或者蒸馏水，直接放入液氮中 3～5 秒，立即提出转入-20℃冰箱（20～30 秒），再取出室温解冻，解冻后再按前面重复 3 次。（注意从液氮中取出不可直接置于室温解冻，这样 EP 管等容易炸裂导致样本损失，所以一定要用冷冻进行梯度解冻））**（此方法不推荐，因温度高低反复时会影响酶活性）；第四种方法是化学裂解（**贴壁培养的细胞，可直接将上清吸去后，直接在孔板或是瓶中加入一定量的裂解液（推荐用 1%-2%的 Triton X-100，覆盖满细胞），置冰上裂解 30～40 分钟（可用显微镜观察细胞破碎情况，如效果不好可延长时间），再用微量移液器吸出待测）。

注：细胞破碎后如溶液均匀无杂质，可直接使用，无须离心；另外破碎后的匀浆液也需要进行预试且测定其蛋白浓度（蛋白浓度可用本公司的 BCA 或考马斯亮蓝试剂盒测定），用于计算。

⑷、**植物组织样本：**取植物组织，用蒸馏水洗净表面污垢后，用吸水纸擦干，取适量于研钵中，剪碎，加入适量液氮，快速研磨成粉，取粉末称重，按重量（g）：体积(mL)=1:9的比例，加入9倍体积的**磷酸盐缓冲液**（**磷酸盐缓冲液**：**0.1mol /L pH7～7.4**），漩涡混匀3分钟，3500转/分以上，离心10分钟取上清即10%匀浆上清液，选取2例用磷酸盐缓冲液稀释成不同浓度进行预实验。**（对于水分含量较多的植物样本如番茄叶片或一些植物嫩叶等也可参照动物组织样本的前处理方法制成10%（或更高浓度）的匀浆）**

注：植物组织匀浆离心后的上清尽量澄清透亮，可适当加大离心转速及离心时间。

⑸、**全血样本：**收集肝素抗凝全血，轻轻颠倒混匀，定量吸取一定量的全血，加入4倍体积的冷蒸馏水，漩涡充分混匀30S，静置10分钟充分溶血（对光观察，溶液澄清透亮），即为5倍溶血液，再用蒸馏水稀释成

不同浓度进行试验。**（注意：全血抗凝时不宜用EDTA）**

⑹、**红细胞样本：**收集肝素抗凝全血，轻轻颠倒混匀，离心分离上层血浆（离心转速根据动物种属有区别，如小鼠一般1000～1500转/分，大鼠、兔子一般2000～2500转/分，人一般2500～3000转/分，转速过高可能会导致红细胞破碎，血浆溶血），在下层红细胞中加入3倍体积的生理盐水，轻轻颠倒混匀，500转/分离心5分钟，弃上清留沉淀红细胞（洗涤红细胞），定量吸取一定量的红细胞，加入9倍体积的冷蒸馏水，漩涡充分混匀30秒，静置10分钟充分溶血（对光观察，溶液澄清透亮），即为10倍溶血液，再用蒸馏水稀释成不同浓度进行试验。

注：全血或红细胞需测定5倍或10倍溶血液中的血红蛋白浓度（本公司有血红蛋白测试液出售 C021），用于结果计算。做不同浓度溶血液预实验摸索时，每个浓度都要做测定空白孔，批量检测时，同浓度情况下，测定空白孔只需做1-2孔。

2、操作表：

	对照孔	对照空白孔	测定孔	测定空白孔
待测样本（μL）	-	-	20	20
蒸馏水（μL）	20	20	-	-
酶工作液（μL）	20		20	-
酶稀释液（μL）	-	20	-	20
底物应用液（μL）	200	200	200	200
轻轻震荡孔板混匀，37℃孵育 20 分钟，取出 450 nm 处酶标仪读数				

3、活力单位定义及计算：

活力定义：在本反应体系中SOD抑制率达50%时所对应的酶量为一个SOD活力单位（U）。

SOD抑制率计算：

$$\text{SOD 抑制率}(\%) = \frac{(A_{对照} - A_{对照空白}) - (A_{测定} - A_{测定空白})}{(A_{对照} - A_{对照空白})} \times 100\%$$

⑴、血清、血浆、细胞培养上清、果汁等液体样本计算公式：

$$\text{SOD 活力}(\text{U/ml}) = SOD\text{抑制率} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \left(\frac{0.24ml}{0.02ml}\right) \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

⑵、动物组织或细胞样本计算公式：

$$\text{SOD 活力}(\text{U/mgprot}) = SOD\text{抑制率} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \left(\frac{0.24ml}{0.02ml}\right) \div \text{待测样本蛋白浓度（mgprot/ml）}$$

⑶、植物组织计算公式：（植物也可参照动物组织计算公式）

$$\text{SOD 活力}(\text{U/g组织}) = SOD\text{抑制率} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \left(\frac{0.24ml}{0.02ml}\right) \times \frac{\text{测试前稀释倍数}}{\text{组织称重（g）} \div \text{所加匀浆缓冲液（ml）}}$$

⑷、全血、红细胞样本计算公式：

$$\text{SOD 活力}(\text{U/mgHb}) = SOD\text{抑制率} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \left(\frac{0.24ml}{0.02ml}\right) \div \text{待测样本血红蛋白浓度（mgHb/ml）}$$

附录Ⅰ：相关样本的稀释倍数参考

1、人血浆：2-10倍稀释；
2、大、小鼠血浆：5-20倍稀释；
3、牛血浆：2-10倍稀释；
4、大、小鼠10%肝（或肾、心肌）匀浆：100-500倍稀释；
5、尿液样本：原液至20倍稀释均有；
6、细胞样本：原液至20倍稀释均有；
7、植物叶片：原液至40倍稀释均有；
8、植物根、茎：原液至5倍稀释；
9、细胞培养液：原液至5倍稀释；
10、普通动物肠10%匀浆：50-100倍稀释；
11、鱼类肝10%匀浆：100-500倍稀释；
12、鱼血清：5-20倍稀释；
13、鱼肌肉（或脑）10%匀浆：原液至10倍稀释；
14、普通动物脑10%匀浆：20-100倍稀释均有；
15、虾蟹血清：原液至50倍均有；
16、虾、蟹肝胰腺10%匀浆：5-20倍稀释；
17、动物粪便10%匀浆：5-20倍稀释；
18、唾液：5-50倍稀释；
19、猪血清：5-20倍稀释；
20、猪肝10%匀浆：50-200倍稀释；
21、猪肌肉10%匀浆：5-20稀释。

注：以上各样本SOD稀释倍数仅供参考，不包括所有情况，样本最佳取样浓度（稀释倍数）需做预试决定，用户可以参考上述稀释倍数来开展预实验。

附录Ⅱ：SOD标准曲线制作

一、前处理：

取Roche公司生产的SOD标准品，用容量瓶定容配成100μg/mL标准贮备液，再用蒸馏水将SOD标准贮备液稀释成50、40、25、20、10、5、4、2U/mL待测。

二、操作表：

	对照孔	对照空白孔	测定孔
不同浓度的标准液（μL）	-	-	20
蒸馏水（μL）	20	20	-
酶工作液（μL）	20		20
酶稀释液（μL）	-	20	-
底物应用液（μL）	200	200	200
混匀，37℃孵育 20 分钟，450 nm 处酶标仪读数			

三、计算公式：

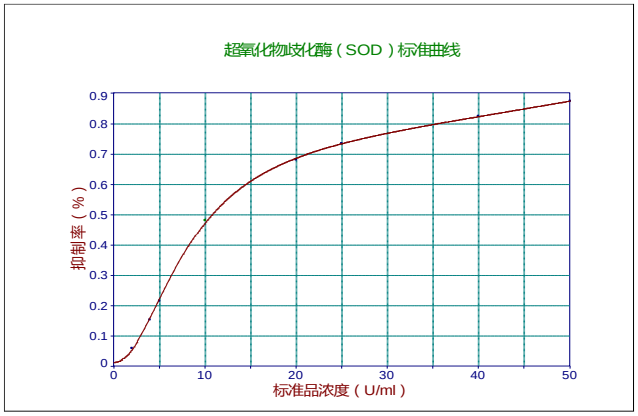
$$\text{SOD 抑制率}(\%) = \frac{(A_{对照} - A_{对照空白}) - (A_{测定} - A_{测定空白})}{(A_{对照} - A_{对照空白})} \times 100\%$$

四：检测结果：

孔别	标准浓度	吸光度	绝对 OD	抑制率
对照		0.3214		
空白		0.0765		
1	2U/mL	0.3063	0.2298	6.16%
2	4 U/mL	0.2837	0.2072	15.38%
3	5 U/mL	0.2684	0.1919	21.63%
4	10 U/mL	0.2036	0.1271	48.12%
5	20 U/mL	0.1544	0.0779	68.18%
6	25 U/mL	0.1414	0.0649	73.48%
7	40 U/mL	0.1194	0.0429	82.50%
8	50 U/mL	0.1073	0.0308	87.42%

注：由于活力定义原因，在不同的定义条件下，活力单位（或活力值）是不同的，故上表抑制率对应的标准品活力与本试剂盒定义的活力值不同，如需按上表所列（或其它相关标准活力水平）的活力值来算，则需制作相应的标准曲线，再用标准曲线拟合的公式计算。

五、绘图如下：



(标准曲线仅供参考,用户不用制作)