

Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit, Hydroxylamine method 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒, 羟胺法

产品简介

超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种在生物体内广泛存在的酶, 主要功能是保护细胞免受氧化应激的损伤。SOD 通过催化超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 的歧化反应, 将其转化为氧气 (O_2) 和过氧化氢 (H_2O_2)。过氧化氢相比超氧自由基, 其活性较低, 可以被细胞内的其他抗氧化酶等进一步分解, 从而减少氧化损伤, 保护细胞。高等动物细胞内一般只有存在于细胞质中的 SOD 即铜锌-SOD (CuZn-SOD) 和存在于线粒体中的锰-SOD (Mn-SOD), 低等动物、单细胞生物和植物中除了铜锌-SOD (CuZn-SOD)、锰-SOD (Mn-SOD), 还有铁-SOD (Fe-SOD)。

超氧化物歧化酶活性检测试剂盒 (羟胺法) 通过黄嘌呤氧化酶法来测定超氧化物歧化酶 (SOD) 的活力, 该方法基于黄嘌呤及其氧化酶反应体系, 能够产生超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)。这些自由基能够进一步氧化羟胺, 生成亚硝酸盐。在显色剂的作用下, 亚硝酸盐使溶液呈现紫红色。通过使用可见分光光度计测量溶液的吸光度, 可以间接反映亚硝酸盐的浓度。当待测样本中存在 SOD 时, SOD 会抑制超氧阴离子自由基的生成。由于 SOD 的这种抑制作用, 导致形成的亚硝酸盐量减少, 从而使得在比色实验中, 含有 SOD 的样本 (测定管) 的吸光度值低于无 SOD 的对照样本 (对照管)。通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。

该试剂盒可测血清、血浆、脑脊液、胸水、腹水、红细胞、白细胞、血小板、心肌培养细胞、肾透析液、尿液、肿瘤培养细胞、各种动植物组织细胞、微生物等的 SOD 活力, 且灵敏度较高, $IC_{50}=0.05 \text{ g/mL}$, 是邻苯三酚法的 18 倍。

产品信息

| | |
|----|-----------|
| 货号 | 60741ES50 |
| 规格 | 50T |

组分信息

| 组分编号 | 组分名称 | 规格 | 储存条件 | 备注 |
|---------|--------|--------|----------------------|--------|
| 60741-A | 试剂一 | 5 mL | 2~8°C, 如有结晶, 热水溶解后使用 | Part 1 |
| 60741-B | 试剂二 | 5 mL | 2~8°C | |
| 60741-C | 试剂三 | 5 mL | 2~8°C | |
| 60741-D | 试剂四稀释液 | 5 mL | 2~8°C | |
| 60741-E | 试剂五 | 粉剂×1 支 | 2~8°C, 避光保存 | |
| 60741-F | 试剂六 | 粉剂×1 支 | 2~8°C, 避光保存 | |
| 60741-D | 试剂四贮备液 | 350 μL | -15~-25°C | Part 2 |

储存条件

2~8°C 避光保存, 有效期 6 个月。

使用说明

【注：正式测定前建议取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定，以使用说明中的第 8 条样本正常参考值为中间值，分别往上浓缩一倍和往下稀释一倍，做三只样本管和一只对照管进行预试验，以确定最佳取样浓度，取抑制率在 45%~50%左右的这一管的样本浓度作为最佳取样浓度。抑制率计算公式： $(\text{对照管吸光度}-\text{测定管吸光度}) \div \text{对照管吸光度} \times 100\%$ 】

1 准备仪器

分光光度计/酶标仪/半自动生化分析仪（波长为 550 nm）；恒温水浴箱（37℃）；台式离心机；漩涡混匀器；移液器；冰乙酸（99%以上）。

2 试剂的前处理

- 1) 试剂一的处理：使用时按 1:9 的体积比加蒸馏水稀释，配成试剂一应用液。
- 2) 试剂四的处理：350 μL 的贮备液与 5 mL 的稀释液按 1:14 比例配制，用多少配多少，现配现用，配成试剂四应用液。
- 3) 试剂五的处理：使用时加蒸馏水 37.5 mL，加热至 70℃ 以上溶解后备用，若加热过程中水分蒸发减少，补充至 37.5 mL。
- 4) 试剂六的处理：使用时加蒸馏水 37.5 mL，常温溶解后备用。
- 5) 显色剂的配制：试剂五溶液:试剂六溶液:冰乙酸以 3:3:2 的体积比配制，用多少配多少。【注：试剂五、试剂六必须分开进行配制，不可将试剂五、试剂六混合后再进行配制，否则不显色】

3 样品的前处理

1) 血清、血浆、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等样本可直接测定，如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。

2) 组织样本的前处理

准确称取动物组织重量，按重量 (g) : 体积 (mL) = 1:9 的比例，加入 9 倍体积的匀浆介质 (推荐 0.86% 或 0.9% 的生理盐水)，冰水浴条件下机械匀浆，3000 转/分，离心 10 分钟，制备成 10% 的匀浆液。

3) 高脂血症血清 (浆) 样本的前处理

- ① 轻度高脂血症 (外观略有混浊)：加等量的生理盐水稀释，然后进行检测；
- ② 中度高脂血症 (外观混浊较明显)：加等量的生理盐水，再加血清 1/2 量 (体积比) 的无水乙醇混匀，然后进行检测；
- ③ 重度高脂血症：50 μL 高脂血清 (浆) 加生理盐水 200 μL 混匀，加无水乙醇 150 μL ，充分混匀 1 分钟，再加入三氯甲烷 150 μL ，充分混匀 1 分钟，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清检测。

4) 红细胞样本的前处理

a 采集新鲜血、或肝素抗凝的静脉血或动脉血 50 μL ，加入含有 1~2 mL 生理盐水的刻度离心管中，500~1000 转/分，离心 10 分钟。

b 用移液器吸去上清液 (要吸干净)，留沉淀的红细胞。

c 在沉淀的红细胞中加入蒸馏水 0.2 mL，混匀，需使红细胞充分溶解 (将溶血液对光观看，呈透明状则已充分溶解)。

d 加入 95% 乙醇 0.1 mL，振荡 30 秒。

e 加入三氯甲烷 (氯仿) 0.1 mL 置漩涡混匀器充分抽提混匀一分钟，3500 转/分，离心 8 分钟。此时液体分三层：上层为 SOD 抽提液，中层为血红蛋白沉淀物，下层为三氯甲烷。若上清有混浊可加入少量 NaCl 后再离心 5 分钟，即可澄清。记录上清液体积，取 5~20 μL ，余下的红细胞抽提液可放冰箱冷冻以备后用。【注：最佳取样量要摸索，确定最佳取样量后再按下表进行正式实验。】

大、小鼠可取内眦血，用玻璃毛细管从内眦部斜向咽喉方向刺入，或者剪尾取血，将血滴在含肝素并烤干的玻片上 (烤干时温度要低于 60℃)，再用移液器取 50 μL 血，作 SOD 抽提。血量少时可取 10~20 μL 抗凝全血 (做慢性动物试验，在饲养过程中可以反复取血 5~6 次)。

5) 植物/药材样本的前处理

准确称取植物组织重量，按重量 (g) : 体积 (mL) = 1:4 的比例，加入 4 倍体积的匀浆介质 (0.1 mol/L, pH 7.0~7.4 的磷酸盐缓冲液, 41403ES)，冰水浴条件下机械匀浆，3500~4000 转/分钟，离心 10 分钟，取上清液进行测定。【注：最佳取样

量要摸索，确定最佳取样量后再按下表进行正式实验。】

4 操作步骤

- 1) 调节波长：分光光度计/酶标仪/半自动生化分析仪（比色测定波长为 550 nm）。
- 2) 按操作表依次加入各试剂。

| 试剂 | 测定管 (mL) | 对照管 (mL) |
|--|----------|----------|
| 试剂一应用液 | 1.0 | 1.0 |
| 样品/蒸馏水 | 样品 0.05 | 蒸馏水 0.05 |
| 试剂二 | 0.1 | 0.1 |
| 试剂三 | 0.1 | 0.1 |
| 试剂四应用液 | 0.1 | 0.1 |
| 用旋涡混匀器充分混匀，37℃恒温水浴 40 分钟，当室温低于 20℃时孵育时间可适当延长至 45 分钟。 | | |
| 显色剂 | 2.0 | 2.0 |
| 混匀，室温放置 10 分钟，于波长 550 nm 处，1 cm 光径比色杯，蒸馏水调零，比色。 | | |

5 计算公式

- 1) 血清、血浆、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等样本计算公式：

定义：每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

总 SOD 活力 (U/mL) = (对照 OD 值 - 测试 OD 值) ÷ 对照 OD 值 ÷ 50% × 反应体系的稀释倍数 × 样本测试前的稀释倍数

- 2) 动物组织/细胞样本计算公式：

定义：每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

总 SOD 活力 (U/mgprot) = (对照 OD 值 - 测试 OD 值) ÷ 对照 OD 值 ÷ 50% × 反应液总体积 (mL) ÷ 取样量 (mL) ÷ 相同匀浆浓度下的蛋白含量 (mgprot/mL) 【注：mgprot 为毫克蛋白数】

- 3) 植物组织匀浆中总 SOD 活力计算公式：

方法一(根据组织匀浆浓度进行换算)

定义：每克组织在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

总 SOD 活力 (U/g 组织湿重) = (对照 OD 值 - 测试 OD 值) ÷ 对照 OD 值 ÷ 50% × 反应液总体积 (mL) ÷ 取样量 (mL) ÷ 匀浆浓度 (g/mL) 【注：匀浆浓度 (g/mL) = 组织湿重 (g) / 匀浆介质体积 (mL)】

方法二(根据蛋白浓度进行换算)

定义：每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

总 SOD 活力 (U/mgprot) = (对照 OD 值 - 测试 OD 值) ÷ 对照 OD 值 ÷ 50% × 反应液总体积 (mL) ÷ 取样量 (mL) ÷ 相同匀浆浓度下的蛋白含量 (mgprot/mL) 【注：mgprot 为毫克蛋白数】

6 取样浓度参考值

- 1) 人血浆 (血清)、1%组织匀浆和胞浆一般为 2 倍稀释或不稀释；
- 2) 心肌灌流液、肾透析液、白细胞悬液和细胞培养液一般增加取样量到 100~200 μL；
- 3) 红细胞抽提液一般要再稀释 5 倍；
- 4) 小鼠血浆 (血清) 2.5 倍左右稀释；
- 5) 大鼠红细胞抽提液要稀释 10 倍左右；
- 6) 所有样本用生理盐水或缓冲液稀释 1 倍后则取样量可加大 1 倍。

7 最佳取样浓度的调整

若百分抑制率大于 60%时（曲线为平坦部分），则需将样品浓度稀释后再测试。若百分抑制率小于 15%时，则需将样品量加大或用更高浓度再测。若百分抑制率大于 60%或小于 10%，各个测定组的结果在检验运行中常常无显著性差异。

8 样本正常参考值

| 物种 | 样本 | T-SOD 活力范围 | 参考稀释倍数 |
|----|-------|-------------------------|-----------------|
| 小鼠 | 血清/浆 | 110.446±21.325 U/mL | 2.5 倍稀释 |
| | 肝组织 | 269.274±23.448 U/mgprot | 稀释到 0.25%组织匀浆浓度 |
| | 脑组织 | 108.790±13.494 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| | 肾组织 | 154.277±15.646 U/mgprot | 稀释到 0.5%组织匀浆浓度 |
| | 心肌组织 | 174.330±19.961 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| | 皮肤组织 | 69.01±19.95 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| | 骨骼肌 | 101.717±12.190 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| 大鼠 | 血清/浆 | 262.786±23.240 U/mL | 10 倍稀释 |
| | 全血 | 21.554±2.116 U/mgHb | / |
| | 肝组织 | 214.689±38.803 U/mgprot | 稀释到 0.25%组织匀浆浓度 |
| | 肾组织 | 136.825±24.763 U/mgprot | 稀释到 0.5%组织匀浆浓度 |
| | 肠组织 | 74.738±11.351 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| | 脑皮质组织 | 79.037±3.996 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| | 海马组织 | 136.863±36.472 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| | 心肌组织 | 128.292±9.219 U/mgprot | 稀释到 0.5%组织匀浆浓度 |
| | 肺组织 | 35.542±15.465 U/mgprot | 稀释到 2%组织匀浆浓度 |
| | 脑组织 | 140.177±26.878 U/mgprot | 稀释到 1%组织匀浆浓度 |
| 鸡 | 血清 | 213.208±73.368 U/mL | / |
| 兔 | 血清 | 429.04±31.60 U/mL | 5 倍稀释 |
| 牛 | 血清 | 123.691±20.008 U/mL | / |
| | 胃液 | 27.880±8.076 U/mL | / |
| 人 | 血清 | 104.2±18.8 U/mL | n=100 人, 2 倍稀释 |
| | 红细胞 | 19246±132 U/gHb | n=40 人, 5 倍稀释 |
| | 全血 | 21.554±2.117 U/mgHb | / |

注意事项

1. 为使试剂充分溶解，所有配制的试剂可在测试前一天配好（试剂四除外），测试前试剂及样品稳定至室温后再用。
2. 为避免误差，样品和试剂要垂直加入试管，不要加在管壁上。
3. 水浴或气浴前要用旋涡混匀器充分混匀。
4. 对照管建议做 2 支，取其平均值；或每 9 支测定管做 1 支对照管。
5. 高等动物体中只有二种 CuZn-SOD 与 Mn-SOD，二者相加等于 T-SOD；单细胞动物及植物中还含有 Fe-SOD，所以同一份标本测 T-SOD 与 Mn-SOD 或者是测 T-SOD 与 CuZn-SOD 时，或者是测 T-SOD 与 Fe-SOD 时只需测其中一对即可。
6. 使用抗凝剂收集血浆时，不能用 EDTA 作为抗凝剂，因为 EDTA 会螯合重金属酶，导致 SOD 活性降低。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本产品仅作科研用途！

