

可见分光光度法

规格: 50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 40 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 11 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.3mL×1 支	2-8℃保存

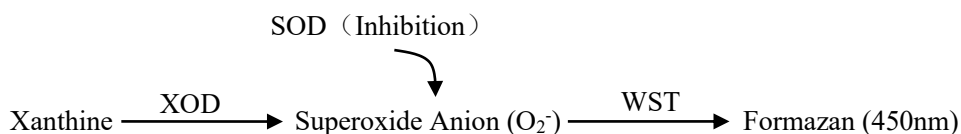
溶液的配制:

- 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=5 μ L：395 μ L（共 400 μ L，约 4S）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=20 μ L：180 μ L（共 200 μ L，约 4T）的比例配制试剂四工作液，现用现配。

产品说明:

SOD (EC 1.15.1.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 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($O_2^{\cdot-}$)， $O_2^{\cdot-}$ 可与 WST-1 反应生成水溶性黄色甲臌，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$ ，从而抑制了甲臌的形成；反应液黄色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、电子天平、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 细菌或培养细胞样本：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）=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。若有浑浊可离心后取上清进行测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂一、试剂三和试剂四工作液 37℃水浴 5min 以上。
3. 样本测定（在 EP 管中按顺序加入下列试剂）

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	225	225	225	225
试剂二工作液	100	-	100	-
试剂三	175	175	175	175
蒸馏水	360	460	450	550
试剂四工作液	50	50	50	50

充分混匀，37℃水浴 30min 后，置于 1mL 玻璃比色皿测定 450nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A1 空白、A2 空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ 。（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加样表中的样本量，但需相应减少测定管和对照管中蒸馏水的体积。

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：

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

(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

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

B. 按样本质量计算

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

C. 按细菌或细胞数量计算

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

V 反总：反应体系总体积，1mL；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 10⁴ 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。

实验实例：

- 1、取 0.1016g 大鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清稀释 50 倍，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.502 - 0.011 = 0.491$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.983 - 0.005 = 0.978$ ，抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 49.796\%$ ，按样本质量计算酶活得：
SOD 活性 (U/g 质量) $= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F = 5423.086 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1024g 绿萝叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清稀释 3 倍，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.490 - 0.105 = 0.385$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.983 - 0.005 = 0.978$ ，抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 60.634\%$ ，按样本质量计算酶活得：
SOD 活性 (U/g 质量) $= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F = 501.338 \text{ U/g 质量}$ 。
- 3、 450×10^4 个 Hela 细胞，加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.523 - 0.027 = 0.496$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.983 - 0.005 = 0.978$ ，抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 49.284\%$ ，按细胞数量计算酶活得：
SOD 活性 (U/10⁴ cell) $= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div N \times F = 0.024 \text{ U/10}^4\text{ cell}$ 。
- 4、取 225μL 兔血清（相应减少蒸馏水用量）按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.855 - 0.158 = 0.697$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.983 - 0.005 = 0.978$ ，抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 28.732\%$ ，按血清（浆）体积计算酶活得：
血清（浆）SOD 活性 (U/mL) $= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \times F = 1.792 \text{ U/mL}$ 。