

氧化应激（MDA/SOD/POD/BCA）检测套装（微量法）

货号：PMK1951BKM

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）等液体样本（POD 主要测植物样本）

产品简介

普美生物的氧化应激（MDA/SOD/POD/BCA）检测套装提供了用于氧化应激检测最常见三种指标：MDA、SOD、POD 的检测试剂以及用于蛋白定量检测的 BCA 试剂。

通过检测 MDA 的水平即可检测脂质过氧化物的水平。脂质过氧化可能导致许多疾病的发生，包括动脉粥样硬化、糖尿病和阿尔茨海默症。丙二醛（MDA）在酸性和高温条件下，可以与硫代巴比妥酸（thiobarbituric acid, TBA）缩合，生成棕红色的三甲川（3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮），其最大吸收波长在 532nm，进行比色后可估测样本中 MDA 的含量。同时测定 600nm 下的吸光度，主要是消除蔗糖的干扰，利用 532nm 与 600nm 下的吸光度的差值，计算 MDA 的含量。

超氧化物歧化酶（SOD, EC1.15.1.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是催化超氧阴离子歧化成 O_2 和 H_2O_2 的酶。SOD 不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是 H_2O_2 主要生成酶，它们是抗暴露于 O_2 的所有细胞中超氧化物自由基毒性的重要抗氧化剂。异常的 SOD 活动与肌萎缩侧索硬化，围产期致死，神经紊乱和癌症等疾病有关。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^- 与四唑盐 WST-8 反应生成水溶性甲臃，后者在 450nm 处有吸收；SOD 可清除 O_2^- ，从而抑制了甲臃的形成，因此产生更少的显色反应。用比色法测定了 SOD 在 450nm 处的抑制活性。SOD 的活性与甲臃的生成量成负相关。

过氧化物酶（POD, EC 1.11.1.7）主要存在于植物和微生物中，可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物，具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。POD 催化 H_2O_2 氧化特定底物生成有色物质，在 650nm 有特征光吸收，通过吸光值变化即可反映过氧化物酶的活性。

BCA 试剂可以进行样本蛋白质浓度测定，实现了蛋白浓度测定的简单、高稳定性、高灵敏度和高兼容性。上述三个指标共用一种提取液和提取方式，比用三个单独的试剂盒分别处理样本，可大大节省样本用量和处理时间，处理好的样本可统一进行蛋白质浓度测定。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
提取液	60mL	120mL	4℃保存
丙二醛（MDA）反应液	15mL	30mL	4℃保存
SOD 反应缓冲液	10mL	20mL	4℃保存
SOD 显色物	1.2mL	2.4mL	4℃避光保存
SOD 酶制剂	60 μL	120 μL	-20℃避光保存
SOD 底物	600 μL	1200 μL	-20℃避光保存
POD 底物	5mL	10mL	4℃避光保存
BCA 试剂 A	100mL	100mL	4℃保存
BCA 试剂 B	3mL	3mL	4℃保存
BSA 标准溶液（5mg/mL）	1mL×2	1mL×2	-20℃避光保存
PBS 溶液	10mL	10mL	4℃保存

产品说明书

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 532nm、600nm、450nm、650nm、562nm 处的吸光度）
恒温箱、水浴锅、制冰机、低温离心机
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）
10kDa MW 超滤管（可选）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前预冷；4℃ 保存。

MDA 反应液：即用型；使用前，平衡到室温；保存于 4℃。如果有沉淀形成，70℃ 水浴至沉淀溶解。

SOD 反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

SOD 显色物：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；4℃ 避光保存。

SOD 酶制剂：使用时，用 SOD 反应缓冲液进行 1:20 稀释，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；保存于 -20℃。

SOD 底物：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；分装保存于 -20℃。如果该组分出现浑浊，使用前请短暂涡旋。

SOD 工作液：临用前配制；每孔准备 85μL SOD 工作液，现配现用，吸取 70μL SOD 反应缓冲液，5μL SOD 底物，10μL SOD 显色物，混匀后待用。

POD 底物：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

BCA 工作液配制：将 BCA 试剂 A 和 BCA 试剂 B 按照体积比 50:1 比例混合，配成 BCA 工作液。如，取 50ml 试剂 A 与 1ml 试剂 B 混合，配成 51ml BCA 工作液。两者混合时会有沉淀形成，彻底混匀后沉淀消失。

样本制备

动植物组织：称取 0.1g，加入 1mL 预冷的提取液，将样本冰上进行匀浆。在 12,000g 转速下 4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。POD 通常只测植物组织，对于植物纤维不多的植物组织，正常操作；对于植物纤维较多的植物组织，冰浴匀浆以后再冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 4℃ 12,000g 离心 10min，取上清待测。

细胞和细菌：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌后，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 12,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清、血浆、尿液（和其它生物学液体）：可直接用来检测，如果有必要，建议将样本稀释成不同的浓度后，再进行检测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用本试剂盒中的 BCA 法蛋白质定量试剂进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，可见光分光光度计去离子水调零。

一. MDA 样本测定：

吸取 0.3mL 反应液于 1.5mL 离心管中，再加入 0.1mL 样本，混匀。95℃ 水浴中保温 30min（盖紧，防止水分散失，使用普通 EP 管可用封口膜缠口后，用针头在盖子上扎一个小孔防止爆盖。也可使用带有螺旋口的 EP 管，也需缠膜），置于冰浴中冷却，10000g，25℃，离心 10min。吸取 200 μL 上清液于微量比色皿或 96 孔板中，测定 532nm 和 600nm 处的吸光度，计算 $\Delta A = A_{532} - A_{600}$ 。

注意：

1. 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 ΔA 大于 1.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数；如果 ΔA 小于 0.001，可增加样本量进行检测。

2. 如果 95℃ 水浴后离心取上清时，沉淀中有红色物质出现表明三甲川产物与大分子物质形成了复合物，可通过超滤除去样本中的大分子物质：取样本上清液，通过 10kDa MW 超滤管过滤（12000g，4℃ 离心 10 min），取滤液，以去除所有蛋白质等大分子物质，置冰上待测。

产品说明书

3. 如果样本本身有很明显红色，可以吸取 0.3mL 去离子水于 1.5mL 离心管中，再加入 0.1mL 样本，混匀作为样本对照。与样本测定同样的反应方式，用样本吸光度的差值减去对照吸光度的差值来消除样本本身颜色的干扰。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{532\text{测定}} - A_{600\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{对照}} = A_{532\text{对照}} - A_{600\text{对照}}$ ， $\Delta \Delta A_{\text{测定}} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$ 。

二. SOD 样本测定:

1. 将工作液 37°C 孵育 15min。
2. 操作表（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中操作）：

试剂 (μL)	样本孔	样本对照孔	空白孔	空白对照孔
样本	20	20	0	0
SOD 工作液	80	80	80	80
SOD 稀释后的酶制剂	20	0	20	0
提取液	0	20	20	40

3. 混匀后，37°C 避光孵育 30min 后，测定 450nm 处吸光度。计算 $\Delta A_{\text{样本}} = A_{\text{样本}} - A_{\text{样本对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}}$ 。

注意：空白孔和空白对照孔只需各做 1 孔；每个样本需要各设置一个样本对照孔。

正式测定前务必选择 1-2 个样本做预实验，若出现 $\Delta A_{\text{样本}}$ 大于 $\Delta A_{\text{空白}}$ ，可能是样本中干扰物的影响太大，可以将样本上清用提取液稀释 2-50 倍后再测，计算公式中乘以相应稀释倍数。

三. POD 样本测定:

1. 底物在 25°C 避光预热 10min。
2. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入 10 μL 样本和 90 μL 底物，混匀，记录 650nm 下 0min 时吸光值 A_1 和 1min 后的吸光值 A_2 。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

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。如果加入底物以后颜色立刻变得较深，可将样本用提取液稀释后测定，计算公式中乘以相应稀释倍数，植物样本通常稀释 5 倍比较适宜。

结果计算

一. MDA 结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = 51.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 51.6 \times \Delta A \div W$$

3. 按细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4\text{)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.1032 \times \Delta A$$

4. 按液体体积计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} = 51.6 \times \Delta A$$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 4×10^{-4} L; ϵ : 丙二醛摩尔消光系数, 155×10^3 L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; 10^9 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

B. 使用微量比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d: 0.5cm 调整为 d: 1cm 进行计算即可。

二. SOD 结果计算

1. 抑制百分率的计算

$$\text{抑制百分率} = (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{样本}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\%$$

注意：尽量使样本的抑制百分率小于 90%，如果计算出来的抑制百分率大于 90%，需将样本用提取液适当稀释再测，计算公式中乘以相应稀释倍数。

2. SOD 酶活性计算:

产品说明书

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 (U/mL)。

(1) 血清（浆）SOD 活力计算：

SOD 活性 (U/mL) = [抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) × V_{反应}] ÷ V_样 × n = 6 × 抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) × n

(2) 组织和细胞 SOD 活力计算：

a. 按样本蛋白浓度计算

SOD 活性 (U/mg prot) = [抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) × V_{反应}] ÷ (V_样 × Cpr) × n = 6 × 抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) ÷ Cpr × n

b. 按样本鲜重计算

SOD 活性 (U/g 鲜重) = [抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) × V_{反应}] ÷ (W × V_样 ÷ V_{样总}) × n = 6 × 抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) ÷ W × n

c. 按细胞数量计算

SOD 活性 (U/10⁴ cells) = [抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) × V_{反应}] ÷ (500 × V_样 ÷ V_{样总}) × n = 0.012 × 抑制百分率 ÷ (1-抑制百分率) × n

V_{反应}：反应体系总体积，0.12mL；V_样：加入反应体系中样本体积，0.02mL；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；n：样本稀释倍数；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细胞总数，500 万。

三. POD 结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmol 氧化型 TMB 定义为一个酶活力单位 U。

POD (U/g 鲜重) = [ΔA × V_{反应} ÷ (ε × d) × 10⁹] ÷ (W × V_样 ÷ V_{样总}) ÷ T = 512.82 × ΔA ÷ W

2. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmol 氧化型 TMB 定义为一个酶活力单位 U。

POD (U/mg prot) = [ΔA × V_{反应} ÷ (ε × d) × 10⁹] ÷ (V_样 × Cpr) ÷ T = 512.82 × ΔA ÷ Cpr

V_{反应}：反应体系总体积，1 × 10⁻⁴ L；ε：氧化态 TMB 在 650nm 处的摩尔吸光系数，3.9 × 10⁴ L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；10⁹：1mol = 1 × 10⁹ nmol；V_样：加入样本体积，0.01mL；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；W：样品质量，0.1g；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

B. 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d：0.5cm 调整为 d：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1040BKM 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1036BKM 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (微量法) (WST-8 法)

PMK1038BKM 过氧化物酶 (POD) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1037BKM 过氧化氢酶 (CAT) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1051BKM 总抗氧化能力 (T-AOC) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

