

超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 试剂盒说明书 (NBT 法)

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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 H₂O₂ 和 O₂。SOD 不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是 H₂O₂ 主要生成酶，在生物抗氧化系统中具有重要作用。

测定原理：

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子(O₂⁻)，O₂⁻可还原氮蓝四唑生成蓝色甲贖，后者在 560nm 处有吸收；SOD 可清除 O₂⁻，从而抑制了甲贖的形成；反应液蓝色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、离心机、移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 200 μL×1 支，4℃ 保存；

试剂三：液体 4mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×2 瓶，4℃ 保存。

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：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（10⁴ 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）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：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。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 560nm。

2、将试剂二用蒸馏水稀释两倍，用多少配多少。（试剂二和蒸馏水 1：1 稀释）

3、将一瓶试剂四用 5mL 蒸馏水溶解（溶解后一周内用完），再用蒸馏水稀释 4 倍，用多少配多少（试剂四和蒸馏水 1：3 稀释）。

4、测定前将试剂一、三和四在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴 5min 以上。

5、样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	45	45
试剂二	2	2
样本	18	
蒸馏水		18
试剂三	35	35
试剂四	100	100

充分混匀，室温静置 30min 后，560nm 处测定各管吸光值 A。

注意事项：

- 1、试剂二为酶，不可冷冻，使用时在冰上放置。
- 2、对照管只需要做一管。
- 3、若对照管吸光值大于 1，建议将试剂二用蒸馏水稀释 7 倍后使用（10 μL 试剂二原液+60 μL 蒸馏水）。
- 4、SOD 为什么有的样本测定管大于对照管，对照管数值在什么范围？

对照管的范围是 0.4-1。对照管吸光值过低可能是

- (1) 试剂二或试剂四没有现配现用；
- (2) 没有按顺序加试剂；

(3) 反应时间不够，可以延长反应时间（反应时间 30min 可以延长到 40min）。对照管吸光值过高可能是试剂二未按操作说明书稀释相应倍数。若出现测定管大于对照管，可能是样本中杂质的影响太大，为了降低杂质的影响一般将样本提取上清液用蒸馏水或提取液稀释 10 倍后再测，通常可以使测定正常。计算公式中乘以相应稀释倍数。

SOD 活性计算：

1、抑制百分率的计算

抑制百分率 = $(A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) \div A_{\text{对照管}} \times 100\%$

尽量使样本的抑制百分率在 10-90% 范围内。如果计算出来的抑制百分率小于 10% 或大于 90%，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，则需将样本用提取液适当稀释；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。

2、SOD 酶活性单位：

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)

。

3、SOD 酶活性计算：

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

(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

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

$= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}}$ 需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

b. 按样本鲜重计算

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

c. 按细菌或细胞个数计算

SOD 活力 (U/10⁴ cell) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$
 $= 0.022 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.018mL；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。