

## 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)

### 试剂盒说明书 (NBT 法)

分光光度法 50 管/48 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  $H_2O_2$  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。

#### 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( $O_2^-$ ),  $O_2^-$  可还原氮蓝四唑生成蓝色甲腈, 后者在 560nm 处有吸收; SOD 可清除  $O_2^-$ , 从而抑制了甲腈的形成; 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:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

#### 试剂的组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂一: 液体 15mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂二: 液体 350 $\mu$ L×1 支, 4°C保存;

试剂三: 液体 10mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂四: 粉剂×2 瓶, 4°C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 ( $10^4$  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°C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°C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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 560nm, 蒸馏水调零。
- 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 水浴 5min 以上。
- 5、样本测定 (在 EP 管中依次加入下列试剂) :

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	240	240
试剂二	6	6
样本	90	
蒸馏水		90
试剂三	180	180
试剂四	510	510

充分混匀, 室温静置 30min 后, 加入 1mL 玻璃比色皿, 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 2, 建议将试剂二用蒸馏水稀释 7 倍后使用 (10μL 试剂二原液+60μL 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 0.8-2。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

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

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)=[抑制百分率÷(1 - 抑制百分率)×V 反总]÷V 样=11.4×抑制百分率÷(1 - 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

$$\text{SOD 活性(U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) = 11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div \text{Cpr}$$

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

$$\text{SOD 活性(U/g 鲜重)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W$$

## c. 按细菌或细胞个数计算

$$\text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.0228 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

V 反总: 反应体系总体积, 1.026mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.09mL; 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。

Lifemall.asia

To be with you