

## 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  $H_2O_2$  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：

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°C保存；

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4°C保存；

试剂二：液体 200 $\mu$ L×1 支，4°C保存；

试剂三：液体 4mL×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、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°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 (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 0.4-1。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

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

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=11.11×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

SOD 活性(U/mg prot)=[抑制百分率÷(1 - 抑制百分率)×V 反总]÷(V 样×Cpr)=11.11×抑制百分率  
÷(1 - 抑制百分率)÷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

SOD 活性(U/g 鲜重)=[抑制百分率÷(1 - 抑制百分率)×V 反总]÷(W ×V 样÷V 样总)=11.11×抑制百分率÷(1 - 抑制百分率)÷W

c. 按细菌或细胞个数计算

SOD 活力(U/10<sup>4</sup> cell)=[抑制百分率÷(1 - 抑制百分率) ×V 反总]÷(500×V 样÷V 样总)=0.022×抑制百分率÷(1 - 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



Lifemall.asia

To be with you