

## 超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）试剂盒（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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>。SOD 不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub><sup>-</sup>)，O<sub>2</sub><sup>-</sup>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 O<sub>2</sub><sup>-</sup>，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：

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℃保存；

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 350 μL×1 支，4℃保存；

试剂三：液体 10mL×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（10<sup>4</sup> 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、 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℃（哺乳动物）或 25℃（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（ $\mu$ L）	测定管	对照管
样本		50
蒸馏水	50	
试剂三（稀释后）	50	50
工作液	800	800
试剂四	100	100

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（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？
- 5、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

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) =  $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}}$   
=  $11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

(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**

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

=11.4 × 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**

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

**c. 按细菌或细胞个数计算**

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

$$= 0.0228 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

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。