

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

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贖, 后者在 560nm 处有吸收; SOD 可清除 O_2^- , 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 200μL×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 (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℃ 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 μ L 试剂二原液+60 μ L 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 对照管-A 测定管)÷A 对照管×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：

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

(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

$$\text{SOD 活性(U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \\ = 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{pr}$$

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

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

c. 按细菌或细胞个数计算

$$\text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ = 0.022 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

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；C_{pr}：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。