超氧化物歧化酶（SOD）-NBT 法试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

超氧化物歧化酶（SOD）（EC 1.15.1.1）在动植物、微生物和培养细胞体内广泛存在，其具有抗衰老、提高机体对多种疾病的抵抗力，能增强机体对外界环境的适应力。

本试剂盒是 NBT 法测定 SOD 活性，NBT 可以和黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO)催化产生的超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)反应产生有颜色物质，后者在 560nm 处有吸收；SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$，从而抑制有色物质形成；反应液颜色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。

二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体×2 支 EP 管	4℃保存	临用前先离心，使液体落入底部，再开盖，每支加 1.1ml 水混匀备用，4℃保存。
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×3 支	4℃保存	临用前甩几下，使粉剂落到底部，每支加 **0.1mL** 试剂五振荡或超声**溶解后**，再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用（务必加 **0.1mL** 试剂五溶解后再加水）。
试剂五	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、超氧化物歧化酶（SOD）的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

① 组织样本：

取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.25g），加入 1mL 提取液，在 4ºC 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。4ºC×12000rpm 离心 10min，取上清作为待测液。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 560nm。

② 测定前将试剂一、三和四 25℃水浴 5min 以上。

③ 用排枪操作，以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。

④ 试剂四每次加样前**务必**混匀，保证试剂的均一性。

⑤ 按照以下加样表，在 96 孔板中依次加入试剂：

试剂名称（μL）	样本管	样本对照管*（可选做）	空白管 1（仅做一次）	空白管 2（仅做一次）
试剂一	60	60	60	60
试剂二	20		20	
蒸馏水		20	20	40
样本	20	20		
试剂三	20	20	20	20
试剂四	80	80	80	80
充分混匀，室温静置 30min 后，560nm 处测定各管吸光值 A。				

【注】：1、若样本量较多，测定前可将试剂一、三和四按照 60μL:20μL:80μL 比例混成一个混合液（需依据当次检测的样本数量混合对应的试剂量），每管务必最后一步加 160μL 该混合液。

2、样本对照管*：提取后样本颜色较深的，一定要做此管，否则抑制率偏低，即 SOD 活性偏低。同时试剂盒由原来可测 96 样变为 48 样。

3、空白管 1 和空白管 2 只需要做一次。

4、若样本对照管大于测定管，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。

5、若样本管数值过低：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）反应温度需室温（25℃）。

五、结果计算：

1、抑制百分率的计算：

抑制百分率=[($A_{空白管1}$-$A_{空白管2}$)-($A_{样本管}$-$A_{样本对照管*}$)]/($A_{空白管1}$-$A_{空白管2}$）×100%

控制样本的抑制百分率在 30-80%范围内。1：若抑制百分率小于 30%，则需重新准备浓度比较高的待测样本；2：若大于 80%，则需将样本粗提液用蒸馏水或提取液适当稀释。

2、SOD 酶活性计算：

SOD 酶活性单位：在上述黄嘌呤氧化酶藕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)。

a.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)×V2]÷(W ×V1÷V)×D

=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率)÷W×D

b.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)×V2]÷(V1×Cpr)×D

=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率)÷Cpr×D

c.按细胞数量计算

SOD 活力(U/10^4 cell)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率) ×V2]÷(500×V1÷V)×D

=0.02×抑制百分率÷(1-抑制百分率)×D

d.按液体体积计算

SOD 活性(U/mL)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V2]÷V1×D

=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率)×D

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL；　　D---样本稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本质量，g；　　500---细胞数量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL ；建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。