

超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）试剂盒说明书（WST-8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H₂O₂和O₂。SOD不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是H₂O₂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(O₂⁻)，O₂⁻可与WST-8反应产生水溶性染料甲臃，后者在450nm处有吸收；SOD可清除O₂⁻，从而抑制了甲臃的形成；反应液黄色越深，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20mL×1瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体150μL×1支，4℃避光保存；

试剂三：液体100μL×1支，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（10⁴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450nm。
2. 试剂三的稀释：将试剂三用蒸馏水稀释50倍，用多少配多少。（试剂三和蒸馏水1：49稀释。
3. 工作液配制：在试剂一加入100μL试剂二，充分混匀。配好的试剂4℃避光可保存一周。（若一次性测定样本较少，可按照实际用量将试剂一和试剂二按照20mL：0.1mL的比例混匀配制）
4. 将一瓶试剂四用5mL蒸馏水溶解（溶解后一周内用完）。
5. 样本测定（在96孔板中依次加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	10	

蒸馏水		10
试剂三（稀释后）	10	10
工作液	160	160
试剂四	20	20

充分混匀，室温静置30min后，450nm处测定各管吸光值A。

注意事项：

1、试剂三为酶，不可冷冻，使用时在冰上放置。

2、对照管只需要做一管。

3、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）试剂三活性低，可以适当减少稀释倍数；（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三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：

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

$$= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

(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

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

$$= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}}$$

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

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

$$= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W$$

c.按细菌或细胞个数计算

SOD活力(U/104 cell)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率) ×V反总]÷(500×V样÷V样总)

=0.04×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, 0.01mL; 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。

www.affandi-e.com