

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

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 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 150 μL×1 支，4℃避光保存；

试剂三：液体 100 μL×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 100 μL 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

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：

- 3、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) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} = 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

（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

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

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) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$

$=0.04 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

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, 0.01mL;

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。