

超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 试剂盒 (WST-8 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_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^- 可与 WST-8 反应产生水溶性染料甲贲, 后者在 450nm 处有吸收; SOD 可清除 O_2^- , 从而抑制了甲贲的形成; 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:

分光光度计、离心机、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 50mL×1 瓶, 4℃避光保存;

试剂二: 液体 300 μ L×1 支, 4℃避光保存;

试剂三: 液体 100 μ L×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 (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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
- 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 250 μ L 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 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂)

试剂名称 (μ 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, 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。
- 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 0.8-2。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: 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)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V 反总]÷(V 样×Cpr)
=20×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

SOD 活性(U/g 鲜重)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V 反总]÷(W ×V 样÷V 样总)=20×抑制百分率÷
(1-抑制百分率)÷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, 1mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; 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。