

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 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($O_2^{\cdot-}$), $O_2^{\cdot-}$ 可与 WST-8 反应产生水溶性染料甲贍, 后者在 450nm 处有吸收; SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$, 从而抑制了甲贍的形成; 反应液黄色越深, 说明 SOD 活性愈低, 反之活性越高。

组成:

| 产品名称 | SR003-100T/96S | Storage |
|---------|----------------|---------|
| 提取液: 液体 | 100ml | 4°C |
| 试剂一: 液体 | 20ml | 4°C避光 |
| 试剂二: 液体 | 150 μ l | 4°C避光 |
| 试剂三: 液体 | 100 μ l | 4°C |
| 试剂四: 粉剂 | 2 瓶 | 4°C |
| 说明书 | 一份 | |

自备仪器和用品:

酶标仪、离心机、移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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 μ l 试剂二，充分混匀。配好的试剂 4 $^{\circ}$ C 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 (μ l) | 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：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

$$\text{SOD 活性(U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}})$$
$$= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}}$$

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

$$\text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$$
$$= 0.04 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

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。

