

## 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  $H_2O_2$  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臞, 后者在 450nm 处有吸收; SOD 可清除  $O_2^-$ , 从而抑制了甲臞的形成; 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°C保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4°C避光保存;

试剂二: 液体 150 $\mu$ L×1 支, 4°C避光保存;

试剂三: 液体 200 $\mu$ L×1 支, 4°C保存;

试剂四: 粉剂×2 瓶, 4°C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°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。

##### 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 20 倍, 用多少配多少。(试剂三和蒸馏水 1: 19 稀释。
3. 工作液配制: 在试剂一加入 100 $\mu$ 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 ( $\mu$ 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**

$$\text{抑制百分率} = (A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) \div A_{\text{对照管}} \times 100\%$$

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) 血清 (浆) SOD 活性(U/mL)=[抑制百分率÷(1 - 抑制百分率)×V 反总]÷V 样=20×抑制百分率÷(1 - 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。

Lifemall.asia

To be with you