

超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(WST-8 法)说明书

(货号: PB1002F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

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臃, 后者在 450nm 处有吸收; SOD 可清除 O_2^- , 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:

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: 15mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体 6mL×5 瓶, -20℃保存;

试剂三: 液体 350uL×1 支, -20℃保存;

试剂四: 液体 10mL×1 瓶, 4℃避光保存。

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、样本测定 (在 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂)



试剂名称 (μL)	测定管	样本对照管* (选做)	对照管	空白管
试剂一	240	240	240	240
试剂二	300	300	300	300
试剂三	6		6	
样品	90	90		
试剂四	180	180	180	180
双蒸水	210	216	300	306

充分混匀， 37°C （哺乳动物）或 25°C （其他物种）孵育 30min 后，450nm 处测定各管吸光值A。

注意事项:

- 1、试剂三为酶，使用时在冰上放置。
- 2、若样本量较多，测定前可将试剂一、二和四按照 $240\mu\text{L}:300\mu\text{L}:180\mu\text{L}$ 比例混成一个混合液（需依据当次检测的样本数量混合对应的试剂量），每比色皿务必最后一步加 $720\mu\text{L}$ 该混合液。
- 3、对照管、空白管只需要做一管。
- 4、样本对照管*：提取后样本颜色较深的，一定要做此管，否则抑制率偏低，即SOD活性偏低。同时试剂盒由原来可测48样变为24样。
- 5、SOD 为什么有的样本测定管大于对照管？

对照管吸光值过低可能是反应时间不够，可以延长反应时间（反应时间 30min 可以延长到 40min）。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

$$\text{抑制百分率} = [(A_{\text{对照管}} - A_{\text{空白管}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{样本对照管}})] / (A_{\text{对照管}} - A_{\text{空白管}}) \times 100\%$$

尽量使样本的抑制百分率在 30-80%范围内。如果计算出来的抑制百分率小于 30%或大于 80%，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:

$$\begin{aligned} \text{(1) 血清(浆) SOD 活性 (U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \\ &= 11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \end{aligned}$$

(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

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



$$=11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div \text{Cpr}$$

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

$$\text{SOD 活性(U/g 鲜重)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W$$

c. 按细菌或细胞个数计算

$$\text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.0228 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$$

V 反总：反应体系总体积，1.026mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.09mL；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。