超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(WST-8 法)说明书

（货号：PB1002W96 微量法 96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臜，后者在 450nm处有吸收；SOD 可清除 O_2^- ，从而抑制了甲臜的形成；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 5mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体 4mL×3瓶，-20℃保存；

试剂三：液体200uL×1支，-20℃保存；

试剂四：液体4mL×1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 、酶标仪预热30min 以上，调节波长至450nm。

2、样本测定（在96 孔板中依次加入下列试剂）

试剂名称（uL）	测定管	样本对照管*（选做）	对照管	空白管
试剂一	45	45	45	45

试剂二	60	60	60	60
试剂三	2		2	
样品	18	18		
试剂四	35	35	35	35
双蒸水	40	42	58	60

充分混匀，37℃（哺乳动物） 或 25℃（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 45μL:60μL:35μL 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 140μL 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96样变为48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

抑制百分率=[($A_{对照管}$-$A_{空白管}$)-($A_{测定管}$-$A_{样本对照管*}$)]/($A_{对照管}$-$A_{空白管}$)×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藕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

=11.11×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

SOD 活性(U/mg prot)=[抑制百分率÷(1－抑制百分率)×V 反总]÷(V 样×Cpr)

=11.11×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)

=11.11×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/10^4 cell)=[抑制百分率÷(1－抑制百分率) ×V 反总]÷(500×V 样÷V 样总)

=0.022×抑制百分率÷(1－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，0.018mL；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。