

超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(WST-8法)说明书

(货号: ADS-W-KY011-196 微板法 196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贖, 后者在 450nm 处有吸收; SOD 可清除 O_2^- , 从而抑制了甲贖的形成; 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 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 4mL×6 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 液体 200uL×2 支, -20℃ 保存;

试剂四: 液体 4mL×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、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	对照管
试剂一	45	45
试剂二	60	60

试剂三	2	2
样品	18	
试剂四	35	35
双蒸水	40	58

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，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 45 μL:60 μL:35 μL 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），每孔务必最后一步加 140 μL 该混合液。
- 3、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 = $(A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) \div A_{\text{对照管}} \times 100\%$

尽量使样本的抑制百分率在 40-70% 范围内。如果计算出来的抑制百分率小于 40% 或大于 70%，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) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}}$
= $11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

(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) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}})$
= $11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}}$

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

SOD 活性 (U/g 鲜重) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$
= $11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W$

c. 按细菌或细胞个数计算

SOD 活力 (U/10⁴ cell) = $[\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$
= $0.022 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率})$

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，0.018mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；C_{pr}：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。