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岐化作用， 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 20mL×1 瓶， 4℃避光保存；

试剂二：液体 150μL×1 支， 4℃避光保存；

试剂三：液体 100μL×1 支， 4℃保存；

试剂四：粉剂×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、 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 100μL 试剂二， 充分混匀。配好的试剂 4℃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(μL)	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 对照管－A 测定管) ÷A 对照管× 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
=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

SOD 活性(U/mg prot)=[抑制百分率÷(1－抑制百分率)×V 反总]÷(V 样×Cpr)
=20×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)
=20×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)
=0.04×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，0.01mL；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。