北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

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

地址： 北京市海淀区丰慧中路 7 号新材料发展大厦 B 座 327 室. 邮编:10010

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。