

超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）试剂盒（WST-8 法）

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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贲，后者在 450nm 处有吸收；SOD 可清除 O_2^- ，从而抑制了甲贲的形成；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：液体 50mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂二：液体 300 μ L×1 支，4℃避光保存；

试剂三：液体 100 μ L×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 (10⁴ 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、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 250 μL 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 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂)

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
|-----------|-----|-----|



| | | |
|----|--|----|
| | | |
| 样本 | | 50 |

| | | |
|----------|-----|-----|
| 蒸馏水 | 50 | |
| 试剂三（稀释后） | 50 | 50 |
| 工作液 | 800 | 800 |
| 试剂四 | 100 | 100 |

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。
- 4、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 0.8-2。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

$$\text{抑制百分率} = (\text{A 对照管} - \text{A 测定管}) \div \text{A 对照管} \times 100\%$$

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)=[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/104 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, 1mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; 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。