

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

分光光度法 50 管/48 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( $O_2^{\cdot-}$ ),  $O_2^{\cdot-}$  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  $O_2^{\cdot-}$ , 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:**

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°C 保存;

试剂一: 液体 50mL×1 瓶, 4°C 避光保存;

试剂二: 液体 300 $\mu$ L×1 支, 4°C 避光保存;

试剂三: 液体 100 $\mu$ L×1 支, 4°C 保存;

试剂四: 粉剂×2 瓶, 4°C 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°C 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°C 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 $\mu$ L 试剂二, 充分混匀。配好的试剂 4°C 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 ( $\mu$ L)	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

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

尽量使样本的抑制百分率在 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：

$$\begin{aligned} \text{(1) 血清(浆) SOD 活性(U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \\ &= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \end{aligned}$$

(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

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/g 鲜重)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 20 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \end{aligned}$$

c.按细菌或细胞个数计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 0.04 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \end{aligned}$$

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。