

超氧化物歧化酶 (SOD) 分型活性检测试剂盒 (WST 法) 说明书

(测 Cu-Zn、Mn、总 SOD 活性)

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操

货号：AC17805

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 18 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 50 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 0.5 mL×1 支	2-8°C保存

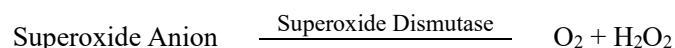
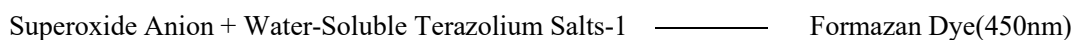
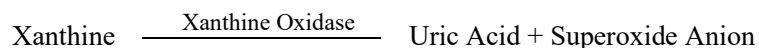
溶液的配制：

- 1、试剂二：使用前先使用掌上离心机离心至管底再吹打混匀；
- 2、试剂二工作液：根据**样本数量**按试剂二：蒸馏水=5μL：245μL（共 250μL，可做约 12 个 Cu-Zn-SOD 样本或 6 个 Mn-SOD 样本）的比例配制试剂二工作液，现用现配；
- 3、试剂四工作液：根据**样本量**按试剂四：蒸馏水=20μL：180μL（共 200μL，约 20T）的比例配制试剂四工作液，现用现配。

产品说明：

SOD (EC 1.15.1.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，根据其辅基结合金属离子的不同，可分为铜锌 SOD、锰 SOD 等类型，铜锌 SOD 主要位于细胞质，锰 SOD 主要位于线粒体。SOD 催化超氧化物阴离子发生歧化作用，生成 H₂O₂ 和 O₂。SOD 不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是 H₂O₂ 主要生成酶，在生物抗氧化系统中具有重要作用。

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子(O₂⁻)，O₂⁻可与 WST-1 反应生成水溶性黄色甲贖，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除 O₂⁻，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。样本经过处理后铜锌 SOD 活性不变，锰 SOD 活性丧失。通过测定总 SOD 活性和铜锌 SOD 活性，可计算得到锰 SOD 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、漩涡混匀仪/振荡器、水浴锅/恒温培养箱、电子天平、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理

1. 总 SOD 活性测定

- 1) 细菌或培养细胞样本: 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): 提取液一体积 (mL)=500-1000:1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液一) 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 8000g 4°C 离心 10min, 取全部上清, 部分用于测定总 SOD 活性。
- 2) 组织样本: 按照组织质量 (g): 提取液一体积 (mL) 为 1:5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液一) 进行冰浴匀浆; 8000g 4°C 离心 10min, 取全部上清, 部分用于测定总 SOD 活性。
- 3) 血清 (浆) 样本: 直接用于测定总 SOD 活性, 若有浑浊可离心后取上清进行测定。

2. 铜锌 SOD 活性测定

- 1) 取上一步提取得到的上清, 按照上清体积 (mL): 提取液二体积 (mL)=2:3 的比例 (建议取 0.2mL 上清加入 0.3mL 提取液二) 混合, 震荡混匀 1min, 4000g 4°C 离心 10min, 取最上层的上清用于测定铜锌 SOD 活性, 此上清即**样本处理上清**, 上清中铜锌 SOD 活性不变, 锰 SOD 活性丧失。

注: 混合液离心后分为 3 层, 取最上层溶液测定即可。

- 2) 按照蒸馏水体积 (mL): 提取液二体积 (mL)=2:3 的比例 (建议取 0.2mL 蒸馏水加入 0.3mL 提取液二) 混合, 震荡混匀 1min, 4000g 4°C 离心 10min, 取最上层的上清用于测定铜锌 SOD 活性的空白管, 此上清即**蒸馏水处理上清**。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂一、试剂三和试剂四工作液 37°C 水浴 5min 以上。
3. 加样表 (按顺序在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	总 SOD 活性				铜锌 SOD 活性			
	测定管 1	对照管 1	空白管 1	空白管 2	测定管 2	对照管 2	空白管 3	空白管 4
样 本	20	20	-	-	-	-	-	-
样本处理上清	-	-	-	-	20	20	-	-
蒸馏水处理上清	-	-	-	-	-	-	20	20
试剂一	45	45	45	45	45	45	45	45
试剂二工作液	20	-	20	-	20	-	20	-
试剂三	35	35	35	35	35	35	35	35
蒸馏水	70	90	90	110	70	90	70	90
试剂四工作液	10	10	10	10	10	10	10	10

充分混匀, 37°C 水浴锅/恒温培养箱反应 30min 后, 置于微量玻璃比色皿/96 孔板测定 450nm 下的吸光度, 空白管 1、空白管 2、空白管 3 和空白管 4 只需做 1-2 次, 每个样本测定管需设置一个对照管。

总 SOD 的记为 A1 测定、A1 对照、A1 空白、A2 空白, 计算 $\Delta A1$ 测定=A1 测定-A1 对照, $\Delta A1$ 空白=A1 空白-A2 空白。

铜锌 SOD 的记为 A2 测定、A2 对照、A3 空白、A4 空白，计算 $\Delta A2$ 测定=A2 测定-A2 对照， $\Delta A3$ 空白=A3 空白-A4 空白。

三、SOD 活性计算

1、抑制百分率的计算

总 SOD 抑制百分率=($\Delta A1$ 空白- $\Delta A1$ 测定)÷ $\Delta A1$ 空白×100%

铜锌 SOD 抑制百分率=($\Delta A3$ 空白- $\Delta A2$ 测定)÷ $\Delta A3$ 空白×100%

尽量使样本的抑制百分率在 30-70%范围内，越靠近 50%越准确。如果计算出来的抑制百分率小于 30%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，则需适当稀释样本；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或者提高加样表中的样本量，但需相应减少测定管和对照管中蒸馏水的体积。**注意同步修改计算公式。**

2、SOD 酶活性单位：在上述黄嘌呤氧化酶偶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。

3、SOD 酶活性计算：

$$(1) \text{血清(浆) SOD 活性 (U/mL)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \times F \\ = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F$$

(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

$$\text{SOD 活性 (U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

B 按样本质量计算

$$\text{SOD 活性 (U/g 质量)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F \\ = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F$$

C 按细菌或细胞数量计算

$$\text{SOD 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F \\ = 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F$$

(3) 锰 SOD 活性=总 SOD 活性-铜锌 SOD 活性

V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：加入反应体系中的样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：蛋白样本浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；F：样本稀释倍数。

注意事项：

- 1、样本和试剂二工作液使用时在冰上放置。
- 2、样本较多时，可按表格配制测定管工作液和对照管工作液（包含试剂一、（试剂二工作液）、试剂三、蒸馏水），试剂四工作液必须最后加入。
- 3、本试剂盒可做 48 个锰-SOD 样本或者 96 个铜锌-SOD 样本。

实验实例：

1、取 0.106g 黄杨叶片加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨，取上清稀释 10 倍，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A1$ 测定= A1 测定-A1 对照=0.399-0.088=0.311， $\Delta A1$ 空白=A1 空白-A2 空白=0.801-0.088=0.713，总 SOD

2、抑制百分率 $=(\Delta A \text{ 空白}-\Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%=56.381\%$ ；取 0.2mL 稀释 10 倍的上清，加入 0.3mL 提取液二，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_2 \text{ 测定} = A_2 \text{ 测定}-A_2 \text{ 对照}=0.827-0.086=0.741$ ， $\Delta A_3 \text{ 空白}=A_3 \text{ 空白}-A_4 \text{ 空白}=1.011-0.081=0.930$ ，铜锌 SOD 抑制百分率 $=(\Delta A \text{ 空白}-\Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%=20.323\%$ ，按样本质量计算酶活得：

总 SOD 活性 (U/g 质量) $=10 \times \text{抑制百分率} \div (1-\text{抑制百分率}) \div W \times F = 1219.438 \text{ U/g 质量}$

铜锌 SOD 活性 (U/g 质量) $=10 \times \text{抑制百分率} \div (1-\text{抑制百分率}) \div W \times F = 240.623 \text{ U/g 质量}$

锰 SOD 活性 (U/g 质量) $=1219.438-240.623 = 978.815 \text{ U/g 质量}$

3、取 0.1104g 兔脾脏加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨，取上清稀释 10 倍，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_1 \text{ 测定} = A_1 \text{ 测定}-A_1 \text{ 对照}=0.348-0.088=0.260$ ， $\Delta A_1 \text{ 空白}=A_1 \text{ 空白}-A_2 \text{ 空白}=0.801-0.088=0.713$ ，总 SOD 抑制百分率 $=(\Delta A \text{ 空白}-\Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%=63.534\%$ ；取 0.2mL 稀释 10 倍的上清，加入 0.3mL 提取液二，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_2 \text{ 测定} = A_2 \text{ 测定}-A_2 \text{ 对照}=0.637-0.084=0.553$ ， $\Delta A_3 \text{ 空白}=A_3 \text{ 空白}-A_4 \text{ 空白}=1.011-0.081=0.930$ ，铜锌 SOD 抑制百分率 $=(\Delta A \text{ 空白}-\Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%=40.538\%$ ，按样本质量计算酶活得：

总 SOD 活性 (U/g 质量) $=10 \times \text{抑制百分率} \div (1-\text{抑制百分率}) \div W \times F = 1578.177 \text{ U/g 质量}$

铜锌 SOD 活性 (U/g 质量) $=10 \times \text{抑制百分率} \div (1-\text{抑制百分率}) \div W \times F = 617.514 \text{ U/g 质量}$

锰 SOD 活性 (U/g 质量) $=1578.177-617.514 = 960.663 \text{ U/g 质量}$

4、取 1000 万细胞加入 1mL 提取液一进行前处理并按测定步骤操作，反应体系中样本量加倍，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_1 \text{ 测定} = A_1 \text{ 测定}-A_1 \text{ 对照}=0.336-0.124=0.212$ ， $\Delta A_1 \text{ 空白}=A_1 \text{ 空白}-A_2 \text{ 空白}=0.714-0.086=0.628$ ，总 SOD 抑制百分率 $=(\Delta A \text{ 空白}-\Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%=66.242\%$ ；取 0.2mL 上清，加入 0.3mL 提取液二，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_2 \text{ 测定} = A_2 \text{ 测定}-A_2 \text{ 对照}=0.525-0.085=0.440$ ， $\Delta A_3 \text{ 空白}=A_3 \text{ 空白}-A_4 \text{ 空白}=0.982-0.081=0.901$ ，铜锌 SOD 抑制百分率 $=(\Delta A \text{ 空白}-\Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\%=51.165\%$ ，修改计算公式后按细胞数量计算酶活得：

总 SOD 活性 (U/10⁴ cell) $=0.005 \times \text{抑制百分率} \div (1-\text{抑制百分率}) \times F = 0.010 \text{ U/10}^4 \text{ cell}$

铜锌 SOD 活性 (U/10⁴ cell) $=0.005 \times \text{抑制百分率} \div (1-\text{抑制百分率}) \times F = 0.005 \text{ U/10}^4 \text{ cell}$

锰 SOD 活性 (U/10⁴ cell) $=0.010-0.005=0.005 \text{ U/10}^4 \text{ cell}$

参考文献：

[1] Peskin A V, Winterbourn C C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1) [J]. Clinica chimica acta, 2000, 293(1-2):157-166.

[2] Hou Z, Zhao L, Wang Y, et al. Purification and characterization of superoxide dismutases from sea buckthorn and chestnut rose[J]. Journal of food science, 2019, 84(4): 746-753.

[3] Cristiana, F., Elena, A. and Nina, Z. Superoxide Dismutase: Therapeutic Targets in SOD Related Pathology[J]. Health, 2014, 06(10):975-988.

相关系列产品：

AC10103/AC10104 多酚氧化酶 (PPO) 活性检测试剂盒

AC10107/AC10108 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性检测试剂盒

AC10105/AC10106 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒

AC10083/AC10084 过氧化物酶 (POD) 活性检测试剂盒

AC17830/AC17831 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒 (WST-1 法)