

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）

可见分光光度法

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：BC5250

规格：50T/24S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 75 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 21 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 0.8 mL×1 支	2-8℃保存

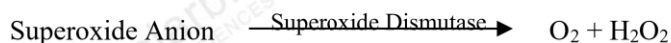
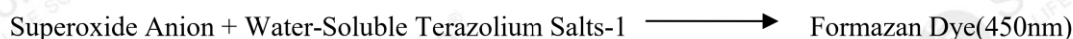
溶液的配制：

- 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：395μL（共 400μL，可做约 4 个 Cu-Zn-SOD 样本或 2 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 4T）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 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。

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-1 反应生成水溶性黄色甲臆，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除 O_2^- ，从而抑制了甲臆的形成；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。

需自备的仪器和用品：





可见分光光度计、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、1mL 玻璃比色皿、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: 上清和提取液二混匀离心后分为 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. 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 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 保温 5min 以上。
3. 样本测定 (在 EP 管中按顺序加入下列试剂)

试剂名称 (μ L)	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	90	90	-	-	-	-	-	-
样本处理上清	-	-	-	-	90	90	-	-
蒸馏水处理上清	-	-	-	-	-	-	90	90
试剂一	225	225	225	225	225	225	225	225
试剂二工作液	100	-	100	-	100	-	100	-
试剂三	175	175	175	175	175	175	175	175
蒸馏水	360	460	450	550	360	460	360	460
试剂四工作液	50	50	50	50	50	50	50	50

充分混匀, 37°C 水浴锅/恒温培养箱反应 30min 后, 置于 1mL 玻璃比色皿测定 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 $\Delta A_2 \text{ 测定} = A_2 \text{ 测定} - A_2 \text{ 对照}$ ， $\Delta A_3 \text{ 空白} = A_3 \text{ 空白} - A_4 \text{ 空白}$ 。

三、SOD 活性计算

1、抑制率的计算：

总 SOD 抑制率 $= (\Delta A_1 \text{ 空白} - \Delta A_1 \text{ 测定}) \div \Delta A_1 \text{ 空白} \times 100\%$

铜锌 SOD 抑制率 $= (\Delta A_3 \text{ 空白} - \Delta A_2 \text{ 测定}) \div \Delta A_3 \text{ 空白} \times 100\%$

尽量使样本的抑制率在 30-70% 范围内，越靠近 50% 越准确。如果计算出来的抑制率小于 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率偏高，则需适当稀释样本；如果测定出来的抑制率偏低，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) 血清（浆）SOD 活性 $(U/mL) = [\text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \times F = 11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times F$

(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

SOD 活性 $(U/mg \text{ prot}) = [\text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times F = 11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div C_{\text{pr}} \times F$

B 按样本质量计算

SOD 活性 $(U/g \text{ 质量}) = [\text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F = 11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F$

C 按细菌或细胞数量计算

SOD 活力 $(U/10^4 \text{ cell}) = [\text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F = 0.0222 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times F$

(3) **锰 SOD 活性 = 总 SOD 活性 - 铜锌 SOD 活性**

V 反总：反应体系总体积，1mL；V 样：加入反应体系中样本的体积，0.09mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；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，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 24 个锰-SOD 样本或者 48 个铜锌-SOD 样本。

实验实例：

1. 取 0.1019g 车前叶加入 1mL 提取液一进行匀浆研磨，取上清稀释 2 倍，按照测定步骤操作，用玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_1 \text{ 测定} = A_1 \text{ 测定} - A_1 \text{ 对照} = 0.3454 - 0.0887 = 0.2567$ ， $\Delta A_1 \text{ 空白} = A_1 \text{ 空白} - A_2 \text{ 空白} = 0.7898 - 0.0694 = 0.7204$ ，总 SOD 抑制率 $= (\Delta A_1 \text{ 空白} - \Delta A_1 \text{ 测定}) \div \Delta A_1 \text{ 空白} \times 100\% = 64.367\%$ ；取 0.2mL 稀释 2 倍的上清，加入 0.3mL 提取液二，按照测定步骤操作，用玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_2 \text{ 测定} = A_2 \text{ 测定} - A_2 \text{ 对照} = 0.7646 - 0.0683 = 0.6963$ ， $\Delta A_3 \text{ 空白} = A_3 \text{ 空白} - A_4 \text{ 空白} = 1.2289 - 0.0580 = 1.1709$ ，铜锌 SOD 抑制率 =

$(\Delta A_3 \text{ 空白} - \Delta A_2 \text{ 测定}) \div \Delta A_3 \text{ 空白} \times 100\% = 40.533\%$ ，按样本质量计算酶活得：

总 SOD 活性 $(U/g \text{ 质量}) = 11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F = 393.896 U/g \text{ 质量}$





铜锌 SOD 活性 (U/g 质量) = $11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F = 148.628 \text{ U/g 质量}$

锰 SOD 活性 (U/g 质量) = $393.896 - 148.628 = 245.268 \text{ U/g 质量}$

2. 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, 用玻璃比色皿测得计算 $\Delta A1 \text{ 测定} = A1 \text{ 测定} - A1 \text{ 对照} = 0.3507 - 0.0699 = 0.2808$, $\Delta A1 \text{ 空白} = A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白} = 0.7898 - 0.0694 = 0.7204$, 总 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 61.022\%$; 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, 用玻璃比色皿测得计算 $\Delta A2 \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A2 \text{ 对照} = 0.7782 - 0.0543 = 0.7239$, $\Delta A3 \text{ 空白} = A3 \text{ 空白} - A4 \text{ 空白} = 1.2289 - 0.0580 = 1.1709$, 铜锌 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 38.176\%$, 按样本质量计算酶活得:

总 SOD 活性 (U/g 质量) = $11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F = 1575.453 \text{ U/g 质量}$

铜锌 SOD 活性 (U/g 质量) = $11.11 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F = 621.404 \text{ U/g 质量}$

锰 SOD 活性 (U/g 质量) = $1575.453 - 621.404 = 954.049 \text{ U/g 质量}$

3. 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, 用玻璃比色皿测得计算 $\Delta A1 \text{ 测定} = A1 \text{ 测定} - A1 \text{ 对照} = 0.3761 - 0.1271 = 0.2490$, $\Delta A1 \text{ 空白} = A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白} = 0.8318 - 0.0608 = 0.7710$, 总 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 67.704\%$; 取 0.2mL 上清, 加入 0.3mL 提取液二, 按照测定步骤操作, 用玻璃比色皿测得计算 $\Delta A2 \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A2 \text{ 对照} = 0.5994 - 0.0590 = 0.5404$, $\Delta A3 \text{ 空白} = A3 \text{ 空白} - A4 \text{ 空白} = 1.0406 - 0.0545 = 0.9861$, 铜锌 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 45.201\%$, 修改计算公式后按细胞数量计算酶活得:

总 SOD 活性 (U/ 10^4 cell) = $0.0056 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F = 0.012 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$

铜锌 SOD 活性 (U/ 10^4 cell) = $0.0056 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div W \times F = 0.005 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$

锰 SOD 活性 (U/ 10^4 cell) = $0.012 - 0.005 = 0.007 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$

相关发表文献:

- [1] Cheng C, Zhao X, Yang H, Coldea TE, Zhao H. Mechanism of selenite tolerance during barley germination: A combination of tissue selenium metabolism alterations and ascorbate-glutathione cycle modulation. Plant Physiol Biochem. 2023 Dec;205:108189. doi: 10.1016/j.plaphy.2023.108189. Epub 2023 Nov 13. PMID: 37979575.

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:

- BC0190/BC0195 多酚氧化酶 (PPO) 活性检测试剂盒
- BC0210/BC0215 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性检测试剂盒
- BC0200/BC0205 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒
- BC0090/BC0095 过氧化物酶 (POD) 活性检测试剂盒

