

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：BC5255

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

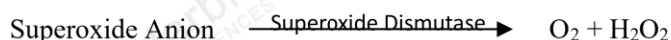
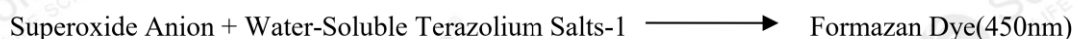
溶液的配制：

- 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：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臃，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除 O₂⁻，从而抑制了甲臃的形成；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/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 (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 (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 (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 (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	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 $\Delta A1 \text{ 测定} = A1 \text{ 测定} - A1 \text{ 对照}$, $\Delta A1 \text{ 空白} = A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白}$ 。



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

三、SOD 活性计算

1、抑制率的计算

总 SOD 抑制率 $= (\Delta A1 \text{ 空白} - \Delta A1 \text{ 测定}) \div \Delta A1 \text{ 空白} \times 100\%$

铜锌 SOD 抑制率 $= (\Delta A3 \text{ 空白} - \Delta A2 \text{ 测定}) \div \Delta A3 \text{ 空白} \times 100\%$

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) $= [\text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \times F = 10 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times F$

(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 prot) $= [\text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \times F = 10 \times \text{抑制率} \div (1 - \text{抑制率}) \div Cpr \times F$

B 按样本质量计算

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

C 按细菌或细胞数量计算

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

(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 $\Delta A1 \text{ 测定} = A1 \text{ 测定} - A1 \text{ 对照} = 0.399 - 0.088 = 0.311$ ， $\Delta A1 \text{ 空白} = A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白} = 0.801 - 0.088 = 0.713$ ，总 SOD 抑制率 $= (\Delta A1 \text{ 空白} - \Delta A1 \text{ 测定}) \div \Delta A1 \text{ 空白} \times 100\% = 56.381\%$ ；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 $\Delta A2 \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A2 \text{ 对照} = 0.827 - 0.086 = 0.741$ ， $\Delta A3 \text{ 空白} = A3 \text{ 空白} - A4 \text{ 空白} = 1.011 - 0.081 = 0.930$ ，铜锌 SOD 抑制率 $= (\Delta A3 \text{ 空白} - \Delta A2 \text{ 测定}) \div \Delta A3 \text{ 空白} \times 100\% = 20.323\%$ ，按样本质量计算酶活得：

$= W \times F = 1219.438 \text{ U/g 质量}$



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

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

- 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 96 孔板测得计算 $\Delta A1 \text{ 测定} = A1 \text{ 测定} - A1 \text{ 对照} = 0.348 - 0.088 = 0.260$ ， $\Delta A1 \text{ 空白} = A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白} = 0.801 - 0.088 = 0.713$ ，总 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 63.534\%$ ；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 $\Delta A2 \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A2 \text{ 对照} = 0.637 - 0.084 = 0.553$ ， $\Delta A3 \text{ 空白} = A3 \text{ 空白} - A4 \text{ 空白} = 1.011 - 0.081 = 0.930$ ，铜锌 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 40.538\%$ ，按样本质量计算酶活得：

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

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

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

- 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 96 孔板测得计算 $\Delta A1 \text{ 测定} = A1 \text{ 测定} - A1 \text{ 对照} = 0.336 - 0.124 = 0.212$ ， $\Delta A1 \text{ 空白} = A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白} = 0.714 - 0.086 = 0.628$ ，总 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 66.242\%$ ；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 $\Delta A2 \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A2 \text{ 对照} = 0.525 - 0.085 = 0.440$ ， $\Delta A3 \text{ 空白} = A3 \text{ 空白} - A4 \text{ 空白} = 0.982 - 0.081 = 0.901$ ，铜锌 SOD 抑制率 = $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 51.165\%$ ，修改计算公式后按细胞数量计算酶活得：

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

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

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

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

BC5160/BC5165 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒 (WST-1 法)

