

## 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒说明书

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作。

**货号：**AC10099

**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，有疑问请及时联系吉至工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 160μL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 11 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：使用前先离心再吹打混匀。根据样本量将试剂二用蒸馏水稀释 10 倍后使用，当天用完。
- 2、试剂四：根据样本量将试剂四用蒸馏水稀释 5 倍后使用，当天用完。

### 产品说明：

SOD (EC 1.15.1.1) 是一种广泛存在于生物体内的金属酶，是重要的氧自由基清除剂，能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( $O_2^-$ )， $O_2^-$ 可还原氮蓝四唑生成蓝色甲臍，后者在 560nm 处有吸收；SOD 可清除  $O_2^-$ ，从而抑制了甲臍的形成；反应液蓝色越深，说明 SOD 活性愈低，反之活性越高。

**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、台式离心机、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（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 细菌或细胞样本：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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织样本：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。
3. 血清（浆）样本：直接检测。

## 二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 560nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂一、三和四 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴 5min 以上。
3. 样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2
样本	90	90	-	-
试剂一	240	240	240	240
试剂二	60	-	60	-
试剂三	180	180	180	180
蒸馏水	400	460	490	550
试剂四	30	30	30	30

充分混匀，37°C 水浴 30min 后，置于 1mL 玻璃比色皿测定 560nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A1 空白、A2 空白，计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ 。如底部有沉淀，混匀后再行测定。（空白管 1 和空白管 2 各只需做 1~2 管，每个样本有一个对照管）

## 三、SOD 活性计算

- 1、抑制百分率的计算：抑制百分率 =  $(\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\%$

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操作表中样本体积，同时减少相同的蒸馏水体积。

- 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：

$$(1) \text{血清(浆) SOD 活性(U/mL)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \times F \\ = 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F$$

- (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

$$\text{SOD 活性 (U/mg prot)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ = 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

### B. 按样本质量计算

$$\text{SOD 活性 (U/g 质量)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F \\ = 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F$$

### C. 按细菌或细胞数量计算

$$\text{SOD 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times F \\ = 0.022 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F$$

V 反总：反应体系总体积，1 mL；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、(二)、三、蒸馏水),试剂四必须最后加入。
- 3、反应完成后,可能有沉淀生成,混匀后测定即可。

### 实验实例:

- 1、取 0.1g 绿萝叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清之后按照测定步骤操作,测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.532 - 0.085 = 0.447$ ,  $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.853 - 0.002 = 0.851$ ,抑制百分率  $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 47.5\%$ ,按样本质量计算酶活得:  
SOD 活性 (U/g 质量)  $= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W = 100.5 \text{U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1g 小鼠肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清之后按照测定步骤操作,测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.608 - 0.109 = 0.499$ ,  $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.853 - 0.002 = 0.851$ ,抑制百分率  $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 41.4\%$ ,按样本质量计算酶活得:  
SOD 活性 (U/g 质量)  $= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W = 78.5 \text{U/g 质量}$ 。
- 3、取 1000 万细胞,加入 1mL 提取液提取离心,之后再按照测定步骤操作,测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.614 - 0.015 = 0.599$ ,  $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.853 - 0.002 = 0.851$ ,抑制百分率  $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 29.6\%$ ,按细菌或细胞数量计算酶活得:  
SOD 活性 (U/ $10^4$  cell)  $= \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}} \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.0046 \text{U}/10^4 \text{cell}$ 。

### 相关发表文献:

- [1] Beibei Li, Yang Ding, Xiuli Tang, et al. Effect of L-Arginine on Maintaining Storage Quality of the White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*). Food and Bioprocess Technology. April 2019; 12:563-574. (IF3.032)
- [2] Yanan Wang, Cheng zhen Liang, Zhigang Meng, et al. Leveraging *Atriplex hortensis* choline monooxygenase to improve chilling tolerance in cotton. Environmental and Experimental Botany. June 2019; 162: 364-373. (IF3.712)
- [3] Yang Yang, Li Jing, Wei Cong, et al. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by swertiamarin in fructose-fed mice. Phytomedicine. June 2019; 59. (IF4.18)
- [4] Siyang Yu, Bo Dong, Zhenfei Fang, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy. Journal of Cellular and Molecular Medicine. July 2018; (IF4.658)
- [5] Qilong Wang, Guosheng Xiao, Guoliang Chen, et al. Toxic effect of microcystin-LR on blood vessel development. Toxicological & Environmental Chemistry. February 2019; (IF3.547)

### 参考文献:

- [1] Spitz D R, Oberley L W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates[J]. Analytical Biochemistry, 1989, 179(1):8-18.
- [2] Masayasu M, Hiroshi Y. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use[J]. Clinica Chimica Acta, 1979, 92(3):337-342.