

## 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒说明书

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作。

货号：AC10100

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，有疑问请及时联系吉至工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 100 μL×1 支	2-8℃ 保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 0.25 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）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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和 O<sub>2</sub>。SOD 不仅是超氧化物阴离子清除酶，也是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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<sub>2</sub><sup>-</sup>)，O<sub>2</sub><sup>-</sup>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<sub>2</sub><sup>-</sup>，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。

产品仅供科研！



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、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、细胞超声破碎仪、研钵/匀浆器、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. 细胞、细菌样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎（功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。8000g 4℃离心 10 分钟，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/酶标仪预热 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min 以上。
3. 样本测定（按顺序加入下列试剂）

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2
样 本	20	20	-	-
试剂一	45	45	45	45
试剂二	20	-	20	-
试剂三	35	35	35	35
双蒸水	70	90	90	110
试剂四	10	10	10	10

充分混匀，37℃水浴 30min 后，560nm 处测定各管吸光值 A。计算 $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 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

$$\text{抑制百分率} = (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\%$$

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。

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) 血清（浆）SOD 活性（U/mL）= [抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) × V<sub>反总</sub>] ÷ V<sub>样</sub> × F = 10 × 抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) × 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）= [抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) × V<sub>反总</sub>] ÷ (V<sub>样</sub> × C<sub>pr</sub>) × F = 10 × 抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) ÷ C<sub>pr</sub> × F

##### b. 按样本质量计算

SOD 活性（U/g 质量）= [抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) × V<sub>反总</sub>] ÷ (W × V<sub>样</sub> ÷ V<sub>样总</sub>) × F = 10 × 抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) ÷ W × F

##### c. 按细菌或细胞数量计算

SOD 活力（U/10<sup>4</sup> cell）= [抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) × V<sub>反总</sub>] ÷ (500 × V<sub>样</sub> ÷ V<sub>样总</sub>) × F = 0.02 × 抑制百分率 ÷ (1 - 抑制百分率) × F

V<sub>反总</sub>：反应总体积，0.2mL；V<sub>样</sub>：加入反应体系中的样本体积，0.02mL；V<sub>样总</sub>：加入提取液体积 1mL；C<sub>pr</sub>：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、样本和试剂二使用时在冰上放置。
- 2、样本较多时，可按表格配制工作液（包含试剂一、二、三），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 大鼠肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.566 - 0.138 = 0.428， $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.802 - 0.041 = 0.761，抑制百分率 =  $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 43.8\%$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{SOD 活性 (U/g 质量)} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W = 77.94 \text{ U/g 质量。}$$

2、取 0.1g 稗草叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清用蒸馏水稀释 4 倍后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.498 - 0.078 = 0.42， $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.771 - 0.042 = 0.729，抑制百分率 =  $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 42.4\%$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{SOD 活性 (U/g 质量)} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 294.4 \text{ U/g 质量。}$$

3、取 20 $\mu$ L 羊血清蒸馏水稀释 50 倍后直接按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.467 - 0.049 = 0.418， $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.771 - 0.042 = 0.729，抑制百分率 =  $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 42.7\%$ ，按血清/血浆体积计算酶活得：

$$\text{血清 (浆) SOD 活性 (U/mL)} = 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times 50 \text{ (稀释倍数)} = 372.6 \text{ U/mL。}$$

4、取 1000 万细胞加入 1mL 提取液，超声破碎，离心取上清，直接按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 对照 = 0.52 - 0.058 = 0.462， $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白 = 0.802 - 0.04 = 0.762，抑制百分率 =  $(\Delta A \text{ 空白} - \Delta A \text{ 测定}) \div \Delta A \text{ 空白} \times 100\% = 39.4\%$ ，按细胞/细菌数量计算酶活得：

$$\text{SOD 活力 (U/104 cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (1000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.0065 \text{ U/104 cell。}$$

**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, Chengzhen 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.

