

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

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 40 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 11 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 0.3mL×1 支	2-8°C保存

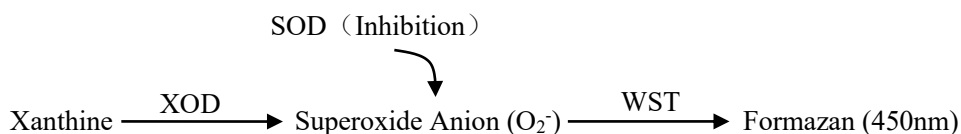
溶液的配制：

- 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：395μL（共 400μL，约 4S）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，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臃，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除  $O_2^-$ ，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。



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、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（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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）：提取液体积（mL）=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°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）样本：直接检测。若有浑浊可离心后取上清进行测定。

## 二、测定步骤

1. 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水浴 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（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2
样 本	90	90	-	-
试剂一	225	225	225	225
试剂二工作液	100	-	100	-
试剂三	175	175	175	175
蒸馏水	360	460	450	550
试剂四工作液	50	50	50	50

充分混匀，37°C水浴 30min 后，置于 1mL 玻璃比色皿测定 450nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A1 空白、A2 空白，计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白。（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。

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：

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

#### (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

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

##### B. 按样本质量计算

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

### C. 按细菌或细胞数量计算

$$\text{SOD 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times \text{V 反总}] \div (\text{N} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \times \text{F}$$
$$= 11.11 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div \text{N} \times \text{F}$$

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; N: 细胞或细菌总数, 以 10<sup>4</sup> 计; 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。

### 实验实例:

- 1、取 0.1016g 大鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清稀释 50 倍, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  测定= A 测定-A 对照=0.502-0.011=0.491,  $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白=0.983-0.005=0.978, 抑制百分率=( $\Delta A$  空白- $\Delta A$  测定)  $\div$   $\Delta A$  空白  $\times$  100%=49.796%, 按样本质量计算酶活得:  
SOD 活性 (U/g 质量) = 11.11  $\times$  抑制百分率  $\div$  (1-抑制百分率)  $\div$  W  $\times$  F = 5423.086 U/g 质量。
- 2、取 0.1024g 绿萝叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清稀释 3 倍, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  测定= A 测定-A 对照=0.490-0.105=0.385,  $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白=0.983-0.005=0.978, 抑制百分率=( $\Delta A$  空白- $\Delta A$  测定)  $\div$   $\Delta A$  空白  $\times$  100%=60.634%, 按样本质量计算酶活得:  
SOD 活性 (U/g 质量) = 11.11  $\times$  抑制百分率  $\div$  (1-抑制百分率)  $\div$  W  $\times$  F = 501.338 U/g 质量。
- 3、450  $\times$  10<sup>4</sup> 个 HeLa 细胞, 加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  测定= A 测定-A 对照=0.523-0.027=0.496,  $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白=0.983-0.005=0.978, 抑制百分率=( $\Delta A$  空白- $\Delta A$  测定)  $\div$   $\Delta A$  空白  $\times$  100%=49.284%, 按细胞数量计算酶活得:  
SOD 活性 (U/10<sup>4</sup> cell) = 11.11  $\times$  抑制百分率  $\div$  (1-抑制百分率)  $\div$  N  $\times$  F = 0.024 U/10<sup>4</sup> cell。
- 4、取 225 $\mu$ L 兔血清(相应减少蒸馏水用量)按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  测定= A 测定-A 对照=0.855-0.158=0.697,  $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白=0.983-0.005=0.978, 抑制百分率=( $\Delta A$  空白- $\Delta A$  测定)  $\div$   $\Delta A$  空白  $\times$  100%=28.732%, 按血清(浆)体积计算酶活得:  
血清(浆) SOD 活性 (U/mL) = [抑制百分率  $\div$  (1-抑制百分率)  $\times$  V 反总]  $\div$  V 样  $\times$  F = 1.792 U/mL。

### 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.

### 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