

超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（WST-1 法）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。

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，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 12 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 0.25mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：使用前先离心再吹打混匀，根据**样本数量**取试剂二，用蒸馏水稀释 100 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 10 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_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臞，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除 O_2^- ，从而抑制了甲臞的形成；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/酶标仪、台式离心机、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（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/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、三和四 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 (μL)	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
蒸馏水	70	90	90	110
试剂四	10	10	10	10

充分混匀，37°C 水浴 30min 后，450nm 处测定各管吸光值 A。分别记为 A 测定、A 对照、A1 空白、A2 空白，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 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：

$$\begin{aligned} \text{(1) 血清(浆) SOD 活性 (U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \times F \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F \end{aligned}$$

(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

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \times F \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div Cpr \times F \end{aligned}$$

b. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/g 质量)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \times F \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F \end{aligned}$$

c. 按细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \times F \\ &= 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times F \end{aligned}$$

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。

实验实例：

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清稀释 100 倍，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.323 - 0.079 = 0.244$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A_{1\text{空白}} - A_{2\text{空白}} = 0.507 - 0.077 = 0.430$ ，抑制百分率 $= (\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) \div \Delta A_{\text{空白}} \times 100\% = 43.26\%$ ，按样本质量计算酶活得：
SOD 活性 (U/g 质量) $= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times F = 7624.25 \text{ U/g 质量}$ 。