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。

货号：D17149

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 60 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 25 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 0.12 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；

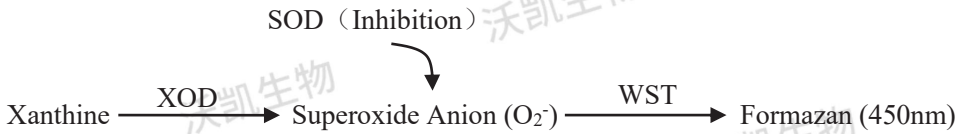
2、 试剂二工作液：根据**样本数量**按试剂二：蒸馏水=5μL：245μL（共 250μL，约 12S）的比例配制试剂二工作液，现用现配；

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，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臜，后者在 450nm 处有吸收峰；SOD 可清除 O_2^-，从而抑制了甲臜的形成；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℃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，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、试剂三和试剂四工作液 37℃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
试剂二工作液	20	-	20	-
试剂三	35	35	35	35
蒸馏水	70	90	90	110
试剂四工作液	10	10	10	10

充分混匀，37℃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

抑制百分率=(ΔA 空白-ΔA 测定) ÷ΔA 空白×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：

（1）血清（浆）SOD 活性（U/mL）=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V 反总] ÷V 样×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 反总] ÷(V 样×Cpr)×F

=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率) ÷Cpr×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 反总] ÷(W×V 样÷V 样总)×F

F

=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率) ÷N×F

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；N：细胞或细菌总数，以 10^4 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 0.1g 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 96 孔板测得计算 ΔA 测定= A 测定-A 对照=0.419-0.047=0.372，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.752-0.045=0.707，抑制百分率=(ΔA 空白-ΔA 测定) ÷ΔA 空白×100%=47.38%，按样本质量计算酶活得：

SOD 活性（U/g 质量）=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率) ÷W×F =4502.09 U/g 质量。

2、 取 0.1g 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 96 孔板测得计算 ΔA 测定= A 测定-A 对照=0.417-0.108=0.309，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.752-0.045=0.707，抑制百分率=(ΔA 空白-ΔA 测定) ÷ΔA 空白×100%=56.29%，按样本质量计算酶活得：

SOD 活性（U/g 质量）=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率) ÷W×F =386.34 U/g 质量。

3、 450×10^4 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 96 孔板测得计算 ΔA 测定= A 测定-A 对照=0.417-0.053=0.364，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.752-0.045=0.707，抑制百分率=(ΔA 空白-ΔA 测定) ÷ΔA 空白×100%=48.51%，按细胞数量计算酶活得：

SOD 活性（U/10^4 cell）=10×抑制百分率÷(1-抑制百分率) ÷N×F =0.021 U/10^4 cell。

4、 取 **50μL** 人血清按照测定步骤操作（同时减少加样表中蒸馏水体积），用 96 孔板测得计算 ΔA 测定= A 测定-A 对照=0.889-0.418=0.471，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=0.752-0.045=0.707，抑制百分率=(ΔA 空白-ΔA 测定) ÷ΔA 空白×100%=33.38%，按血清（浆）体积计算酶活得：

血清（浆）SOD 活性（U/mL）=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V 反总] ÷V 样×F =2.004 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.

本产品仅用于科学研究或者工业应用等非医疗目的
不可用于人类或动物的临床诊断或治疗，非药用，非食用