

超氧化物歧化酶(SOD)—WST-8 法测定试剂盒说明书

(货号:ADS-W-KY011-196 微板法 196 样 有效期; 9 个月)

一、指标介绍:

超氧化物歧化酶 (SOD) (EC 1.15.1.1) 在动植物、微生物和培养细胞体内广泛存在, 它具有抗衰老、提高机体对多种疾病的抵抗力, 能增强机体对外界环境的适应力, 是生物体内一种重要的抗氧化酶。

目前有多种 SOD 活性测定法, 其中 NBT(氮蓝四唑)法产生的甲臍染料水溶性差, 易和被还原的黄嘌呤氧化酶相互作用, 抑制百分率达不到 100%等, 从而使检测的灵敏度和精确度受到影响; 本试剂盒采用的是目前稳定性更好、灵敏度更高的 WST-8 法, WST-8 可以和黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO)催化产生的超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)反应产生水溶性的甲臍染料, 后者在 450nm 处有最大吸收; SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$, 从而抑制甲臍的形成; 反应液颜色越深, 说明 SOD 活性愈低, 反之活性越高。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×2 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 4 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底再开盖; 2. 加入 1.1 mL 蒸馏水充分溶解, -20℃保存。
试剂三	液体 2mL×2 瓶	4℃避光保存	
试剂四	粉剂 9 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底再开盖; 2. 加入 0.1mL 试剂五振荡或超声溶解后, 再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用(务必加 0.1mL 试剂五溶解后再加水), 一周内用完。
试剂五	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.25g), 加入 1mL 提取液, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或用各类常见匀浆器)。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清作为待测液。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 450nm。
- ② 测定前将试剂一、三和四 25℃水浴 5min 以上。
- ③ 用排枪操作，以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。
- ④ 试剂四每次加样前务必混匀，保证试剂的均一性。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	样本管	样本对照管	空白管 1 （仅做一次）	空白管 2 （仅做一次）
试剂一	70	70	70	70
试剂二	20		20	
蒸馏水		20	20	40
样本	20	20		
试剂三	10	10	10	10
试剂四	80	80	80	80
充分混匀，室温（25℃）避光静置 30min（准确时间）后，于 450nm 处读取各管吸光值 A。				

【注】：1、若样本量较多，测定前可将试剂一、三和四按照 70μL:10μL:80μL 比例混成一个混合液（需依据当次检测的样本数量混合对应的试剂量），每孔务必最后一步加 160μL 该混合液。

- 2、若样本管数值过低，可能是：①试剂二或试剂四没有现配现用；②没有按顺序加试剂；③反应温度需室温（25℃）。

五、结果计算：

1、抑制百分率的计算：

$$\text{抑制百分率} = \frac{(A_{\text{空白管1}} - A_{\text{空白管2}}) - (A_{\text{样本管}} - A_{\text{样本对照管}})}{(A_{\text{空白管1}} - A_{\text{空白管2}})} \times 100\%$$

若没有做 $A_{\text{样本对照管}}$ 则值为 0 代入公式计算抑制百分率；控制抑制百分率在 30-80% 范围内。1：若小于 30%，可增加取样质量 W（如增至 0.2g），或增加样本加样体积 V1（如由 20μL 增至 50μL 或更多，则试剂一相应减少，保持总体积不变）；2：若大于 80%，则需将样本粗提液用蒸馏水或提取液适当稀释。则改变后的 W 和 V1 和稀释倍数 D 代入公式计算。

2、SOD 酶活性计算：

SOD 酶活单位：在上述黄嘌呤氧化酶耦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 (U/mL)。

a. 按样本鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/g 鲜重)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D \end{aligned}$$

b. 按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

c. 按液体体积计算：

$$\text{SOD 活性 (U/mL)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div V_1 \times D$$

$$=10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D$$

d.按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{SOD 活力}(\text{U}/10^4 \text{ cell}) &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2---反应体系总体积, 0.2mL;

D---样本稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。