

超氧化物歧化酶(SOD)—WST-8 法活性测定试剂盒说明书

(货号:G0102W 微板法 196 样)

一、产品简介:

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, 其具有抗衰老、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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀, 且用蒸馏水稀释一倍后再使用。
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 μ L×4 支	4℃保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部, 每支再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解, -20℃保存。
试剂三	液体 1.1mL×2 支	4℃保存	
试剂四	粉剂×6 支	4℃保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 每支加 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、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 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：

试剂名称 (μL)	样本管	样本对照管* (可选做)	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、**样本对照管***：提取后样本颜色较深：如棕褐色或黄色，或 A 对照管值>0.1，可做此管，否则抑制率偏低，即 SOD 活性偏低。若为相同样本可做一组样本对照管，若每个样本都做对照管则该试剂盒由原来可测 196 样变为 98 样。
- 3、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：

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

若没有做 A_{样本对照管} 则值为 0 代入公式计算抑制百分率；控制样本的抑制百分率在 30-80% 范围内。1：若抑制百分率小于 30%，则需重新准备浓度比较高的待测样本；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。

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：

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

d. 按液体体积计算：

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

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；

C_{pr}---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。