

超氧化物歧化酶(SOD)—WST-8 法活性测定试剂盒说明书

(微板法 48 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)法产生的甲臌染料水溶性差, 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臌染料, 后者在 450nm 处有最大吸收; SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$, 从而抑制甲臌的形成; 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 60mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 5mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 μ L×1 支 | 4°C保存 | 临用前离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解, -20°C保存。 |
| 试剂三 | 液体 0.6mL×1 支 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 粉剂×2 支 | 4°C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 1mL×1 支 | 4°C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°C 或冰浴进行匀浆(或用各类常见匀浆器)。4°C×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°C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°C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 处测定各管吸光值 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 48 样变为 24 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：

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

若没有做 A_{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：

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

b.按样本蛋白浓度计算：

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

c.按细胞数量计算：

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

d.按液体体积计算：

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

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。