

超氧化物歧化酶(SOD)—WST-8 法活性测定试剂盒说明书

(货号: G0101F 分光法 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)法产生的甲臞染料水溶性差,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臞染料,后者在 450nm 处有最大吸收;SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$,从而抑制甲臞的形成;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℃保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 μ L×3 支	4℃保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部,每支分别加 1.1 mL 蒸馏水充分溶解, -20℃保存。
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
试剂四	粉剂×5 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 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵。

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 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 450nm,蒸馏水调零。

② 测定前将试剂一、三和四 25℃水浴 5min 以上。

- ③ 试剂四每次加样前**务必**混匀，保证试剂的均一性。
 ④ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）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	280	280	280	280
试剂二	60		60	
蒸馏水		60	60	120
样本	60	60		
试剂三	30	30	30	30
试剂四	320	320	320	320
充分混匀，室温（25℃）避光静置 30min（准确时间）后，于 450nm 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 280 μL :30 μL :320 μL 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），每管务必最后一步加 630 μL 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 60 μL 增至 120 μL 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：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/g 鲜重)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 12.5 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D \end{aligned}$$

b.按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (V1 \times Cpr) \times D \\ &= 12.5 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

c.按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.025 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$

d.按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div V1 \times D \\ &= 12.5 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.06mL； V2---反应体系总体积，0.75mL；

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。