

Superoxide dismutase (SOD) Activity Assay Kit-WST-8

超氧化物歧化酶(SOD)-WST-8 法试剂盒说明书

货号: G0101W | 方法: 微板法 | 规格: 96 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 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 μ L×2 支	4°C 保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部, 每支再分别加 1.2mL 蒸馏水充分溶解, 可-20°C 分装保存 (尽量避免反复冻融)。
试剂三	液体 1.1mL×1 支	4°C 保存	
试剂四	液体 10mL×1 瓶	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、水浴锅、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、二、三和四解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。

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 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

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。				

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/g 鲜重)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D \end{aligned}$$

b. 按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (V1 \times Cpr) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

c. 按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$

d. 按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div V1 \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$

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；

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。