

## 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: G0101W48 | 方法: 微板法 | 规格: 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°C保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 $\mu$ L×1 支	4°C保存	临用前离心或用几下使试剂落入底部, 再加 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 0.6mL×1 支	4°C保存	
试剂四	液体 5mL×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°C) 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<sub>样本对照管</sub> 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:

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

#### 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。