

总超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (WST-8 法) Total Superoxide Dismutase Assay Kit with WST-8

产品编号	产品名称	包装规格
NBS9040	总超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (WST-8 法)	100T

产品简介:

总 SOD 活性检测试剂盒 (WST-8 法) 利用 WST-8 显色反应, 通过比色法精准测定细胞、组织及其他样本中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活力, 灵敏度高达 0.5U/mL。

SOD 是生物体内关键的抗氧化酶, 可催化超氧阴离子 (O_2^-) 歧化为过氧化氢 (H_2O_2) 和氧气 (O_2)。反应体系中, 黄嘌呤氧化酶 (XO) 产生的超氧阴离子与 WST-8 生成水溶性甲臃染料; SOD 通过清除超氧阴离子抑制该显色反应, 其活力与甲臃产量呈负相关, 据此计算 SOD 活性。

本试剂盒特别引入过氧化氢酶, 可消除样本中内源性过氧化氢的干扰 (即使 H_2O_2 浓度高达 0.1mM, 结果仍不受影响), 适用于细胞/组织匀浆上清、全血、红细胞裂解液及血清等多种生物样本。

保存条件:

-20°C 避光保存 (一年有效)

产品组成:

组分	名称	规格
NBS9040-01	SOD 样品制备液	50ml
NBS9040-02	SOD 检测缓冲液	50ml
NBS9040-03	WST-8	800 μ l
NBS9040-04	酶溶液	100 μ l
NBS9040-05	反应启动液 (40 \times)	60 μ l

产品使用：**1. 样品准备：****a) 细胞样品：**

对于贴壁细胞：吸净培养液，用预冷的 PBS 或生理盐水洗涤一遍，按照每 1×10^6 的细胞加入 100-200ul 的比例加入 SOD 样品制备液，适当吹打以充分裂解细胞；对于悬浮细胞：600g 离心 5min 收集细胞，用预冷的 PBS 或生理盐水洗涤一遍，按照每 1×10^6 的细胞加入 100-200 μ l 的比例加入 SOD 样品制备液，适当吹打，以充分裂解细胞。4°C 约 12,000g 离心 3-5min，取上清作为待测样品。

b) 组织样品：

将动物用生理盐水（含 0.16mg/ml 肝素钠）灌流清除血液后获取组织样品。取适量的组织样品，加入预冷的 PBS 冰浴匀浆。随后匀浆液 12000g，4°C 离心 3-5min，取上清液作为待测样品。

c) 血浆/红细胞：

用抗凝管收集血液，颠倒混匀。600g，4°C 离心 10min，移取上清至 1ml 离心管中，适量生理盐水稀释后即可。红细胞样品可以参考悬浮细胞样品的制备方法。

d) 测定蛋白浓度(建议 BCA 法)：通常 10-20 μ g 蛋白的细胞或组织匀浆液样品中的 SOD 平均活力约 1 个活力单位左右（不同细胞和组织的差异会比较大，该活力范围仅作参考）。每种样品准备 20-100 μ g 蛋白量通常已经足够用于后续检测。

e) 根据蛋白浓度和预计的蛋白使用量，用本试剂盒提供的 SOD 检测缓冲液适当稀释样品。准备好的样品如果当天测定，可以冰浴保存；如果当天不能完成测定，可以-70°C 冻存，但建议尽量当天完成测定。

2. 试剂准备：**a) WST-8/酶工作液配制（每孔 160 μ l）：**

151 μ l SOD 检测缓冲液+8 μ l WST-8+1 μ l 酶溶液（需先离心混匀）

根据待检测样品（包括标准品）的数量，配置适量的 WST-8/酶工作液：

待测样品数量	1	10	20	50
SOD 检测缓冲液 (μ l)	151	1510	3020	7550
WST-8 (μ l)	8	80	160	400
酶溶液 (μ l)	1	10	20	50
WST/酶工作液 (μ l)	160	1600	3200	8000

注意：配制好的 WST-8/酶工作液 4℃或冰浴保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

b. 反应启动工作液：

1μl 反应启动液 (40×) + 39μl SOD 检测缓冲液

根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的反应启动工作液。配制好的反应启动工作液 4℃或冰浴保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

c. (可选) SOD 标准品：

需自备 SOD 标准品，用本试剂盒提供的 SOD 样品制备液（当样品用试剂盒提供的 SOD 样品制备液制备时）或 SOD 检测缓冲液（当样品为血液等无需处理的样品时）将 SOD 标准品稀释至如下系列浓度：200U/ml, 100U/ml, 50U/ml, 20U/ml, 10U/ml, 5U/ml, 2U/ml。在随后的检测中可以各取 20μL 参考样品进行检测。

注：为避免稀释后 SOD 酶活性的下降，SOD 标准品宜现稀释现使用；本试剂盒对于 SOD 的检测并不需要 SOD 作为标准品，但可以使用 SOD 标准品作为阳性对照或作为对 SOD 活性定量的参考。

3. 样品检测：

a) 参考下表使用 96 孔板设置样品孔和各种空白对照孔。并按下表依次加入待测样品和其它各种溶液。加入反应启动工作液后充分混匀。注意：加入反应启动工作液后反应即会开始，可以在低温操作或用排枪操作以减小各孔间因加入反应启动工作液的时间先后差异而导致的误差。

组分	样品孔	空白对照 1	空白对照 2	空白对照 3
样品/标准品	20μl	-	-	20μl
SOD 检测缓冲液	-	20μl	40μl	20μl
WST-8/酶工作液	160μl	160μl	160μl	160μl
反应启动工作液	20μl	20μl	-	-

*如果样品有颜色或含有抗氧化物质，则需设置空白对照 3；如果样品没有颜色并且也不含有抗氧化物则无需设置空白对照 3。

b) 37℃孵育 30 分钟。注：孵育 25 至 35 分钟检测出来的 SOD 活力无显著差异，但为保证检测结果的一致性，推荐孵育 30 分钟。

c) 在 450nm 测定吸光度。如无 450nm 滤光片，可以使用 420-480nm 的滤光片。也

可以选择设定 600nm (或 600nm 以上, 如 650nm) 作为参比波长, 450nm 吸光度的读数扣除参比波长的吸光度读数即可作为实测读数。

4. 结果计算:

a) 抑制百分率:

参考如下计算公式计算抑制百分率

有空白对照 3:

$$\text{抑制百分率} = [(A_{\text{空白对照 1}} - A_{\text{空白对照 2}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白对照 3}})] / (A_{\text{空白对照 1}} - A_{\text{空白对照 2}}) \times 100\%$$

无空白对照 3:

$$\text{抑制百分率} = (A_{\text{空白对照 1}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{空白对照 1}} - A_{\text{空白对照 2}}) \times 100\%$$

如果计算出来的抑制百分率小于 30%或大于 70%, 则通常需要把该样品重新测定。尽量使样品的抑制百分率在 30-70%范围内。如果测定出来的抑制百分率偏高, 则需适当稀释样品; 如果测定出来的抑制百分率偏低, 则需重新准备浓度较高的待测样品。

b) 酶活力单位定义:

在上述黄嘌呤氧化酶偶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(unit)。注意: SOD 的活力单位的定义方式有很多种, 不同的活力单位需根据其定义的不同进行适当换算。

c) 酶活力计算:

$$\text{SOD 活力 (units)} = \text{抑制百分率} / (1 - \text{抑制百分率})$$

例如当抑制百分率为 50%时, 待测样品中 SOD 酶活力单位 = 50% / (1 - 50%) = 1unit;

当抑制百分率为 60%时, 待测样品中 SOD 酶活力单位 = 60% / (1 - 60%) = 1.5units。

d) 单位换算:

根据样品的类型, 细胞/组织的匀浆液/红细胞抽提液, 可以根据样品的蛋白浓度和稀释倍数, 将 SOD 活力单位换算为 U/g 或 U/mg 蛋白。如果样品为红细胞抽提液, 可以根据血红蛋白含量, 可换算为 U/g 血红蛋白或 U/mg 血红蛋白。

5. 可选方案:

a) 标准曲线法: 可以先使用本试剂盒绘制 SOD 标准品的抑制百分率曲线, 然后根据样品检测到的抑制百分率对比标准品的抑制百分率曲线计算出样品中的 SOD 酶活力单位。本方案仅供参考, 使用本试剂盒时不必使用本方案进行检测和计算。此外, 本方案需确保标准品的酶活力数据可靠, 不会因为标准品的保存问题而导致实际酶活力下降。

b) 动力学法: 如果条件许可, 使用本试剂盒时也可以使用动力学方法检测 SOD 的酶活

力。通常在步骤 3(a)后可以在 37°C 孵育同时在 450nm 连续测定吸光度 30 分钟。根据 30 分钟内的吸光度变化的斜率 (K) 计算出抑制百分率:

$$\text{抑制百分率} = [(K_{\text{空白对照 1}} - K_{\text{空白对照 2}}) - (K_{\text{样品}} - K_{\text{空白对照 3}})] / (K_{\text{空白对照 1}} - K_{\text{空白对照 2}}) \times 100\%$$

其余的计算方法同上述非动力学的计算方法。动力学方法的检测和计算更加精确一些, 但检测起来相对要麻烦一些。使用本试剂盒通常使用非动力学方法即可。

注意事项:

1. 待测样品可-70°C 保存 1 个月, 需注意反复冻融会导致 SOD 部分失活。
2. 样品制备液中不可含 Triton X-100 等去垢剂。
3. 抗氧化物会对本试剂盒的检测产生干扰, 例如 0.1mM ascorbic acid, 5mM GSH 都会使测定出来的吸光度显著升高。所以需要设置使用说明中的空白对照 3 来消除样品中的抗氧化物的干扰。
4. 标准品稀释时所用的稀释液应尽量与样品一致。样品用试剂盒提供的 SOD 样品制备液制备时, 标准品也建议使用 SOD 样品制备液进行稀释; 当样品为血液等无需处理的样品时, 建议使用试剂盒提供的 SOD 检测缓冲液稀释标准品。
5. 酶溶液需离心混匀, 避免分层。
6. 建议每样品做复孔, 提高准确性。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其他用途!