

超氧化物歧化酶 SOD 活性检测试剂盒 (WST-8 法)

Total Superoxide Dismutase Activity Assay Kit with WST-8

产品信息

产品名称	编号	规格
超氧化物歧化酶 SOD 活性检测试剂盒 (WST-8 法)	DY80211	100T

产品描述

超氧化物歧化酶 (SOD) 能够催化超氧阴离子歧化, 生成过氧化氢(H_2O_2)和单质氧气(O_2), 是一种重要的抗氧化酶。目前测定 SOD 比较先进的方法包括 WST-1 法和 WST-8 法, 其中 WST-8 法比 WST-1 法更加稳定、灵敏度更高。本试剂盒采用了目前测定 SOD 方法中稳定性更好、灵敏度更高的 WST-8 法, 可以检测出低达 0.5U/ml 的超氧化物歧化酶。WST-8 的反应产物是稳定的水溶性产物, 可以通过单个时间点的吸光度检测来测定 SOD 活力, 适合高通量筛选研究。本试剂盒提供的 SOD 样品制备液能直接裂解细胞, 无需匀浆, 操作更加便捷。本试剂盒通过添加适量过氧化氢酶等特殊方法, 能有效去除常规样品中过氧化氢的干扰。例如, 对于 SOD 标准品的检测, 标准品中添加高达 0.1mM 的过氧化氢时, 对于检测结果仍无显著影响。本试剂盒可以检测细胞或组织匀浆液上清、全血、红细胞抽提物、血清(浆)、胸水、腹水、肾透析液、尿液、红细胞、白细胞、血小板、心肌培养细胞、肿瘤培养细胞、各种动植物组织细胞级亚细胞等生物样品中的 SOD 活力。

产品组分

产品组分名称	规格	保存
SOD 样品制备液	50ml	-20°C保存
SOD 检测缓冲液	50ml	
WST-8	800ul	
酶溶液	100ul	
反应启动液(40x)	60ul	

保存方式

-20°C避光保存, 有效期一年。

操作步骤

1. 样品的准备

- 细胞样品的准备: 对于贴壁细胞, 吸净细胞培养液, 用 4°C或冰浴预冷的 PBS 或生理盐水洗涤一遍, 按照每 100 万细胞加入 100-200 微升的比例加入本试剂盒提供的 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 5 分钟收集细胞, 用上述方法洗涤一遍, 按上述比例加入 SOD 样品制备液, 适当吹打, 以充分裂解细胞。4°C约 12,000g 离心 3-5 分钟, 取上清作为待测样品。
- 组织样品的准备: 动物用生理盐水(0.9% NaCl, 含有 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,按照每 10mg 组织加入 100 微 SOD 样品制备液的比例在 4°C或冰浴进行匀浆。4°C约 12,000g 离心 3-5 分钟,取上清作为待测样品。

c) 血浆或红细胞样品的准备:用抗凝管收集血液,颠倒混匀。4°C,600g 离心 10 分钟,移取上清至另一新的 1ml 离心管中,适量生理盐水稀释后即可作为血浆样本进行检测。红细胞样品可以参考悬浮细胞样品的制备方法,或其它不含 Triton X-100 等去垢剂的样品制备方法。

d) 样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。每种样品准备 20-100ug 蛋白量就足够用于后续检测。

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。样品若当天测定,则冰浴保存;否则可以-70°C冻存,但建议尽量当天完成测定。

2.试剂盒的准备工作

a) WST-8/酶工作液的配制:按照每个反应 160μl 的体积配制适量的 WST-1/酶工作液。均匀混合 151μl SOD 检测缓冲液、8uL WST-8 和 1ul 酶溶液,即可配制成 160μl WST-8/酶工作液(可成比例放大)。根据待检测样品(包括标准品)的数量,配制适量的 WST-8/酶工作液。配制好的 WST-8/酶工作液 4°C或冰浴保存,可以在当天使用,但建议尽量现配现用。注意:使用前先轻轻离心一下,然后适当混匀后再使用。

b) 反应启动工作液的配制:把试剂盒中的反应启动液(40x)融解后混匀,按照每 1μl 反应启动液(40x)加入 39μl SOD 检测缓冲液的比例进行稀释,混匀后即反应启动工作液。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°C或冰浴保存,可以在当天使用,但建议尽量现配现用。

c) (可选做)SOD 标准品准备: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:100U/ml,50U/ml,20U/ml,10U/ml,5U/ml,2U/ml,1U/ml。在随后的检测中可以各取 20 微升,参考样品进行检测。说明: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.样品测定

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。

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

*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没有必要设置空白对照 3。

b) 37°C孵育 30 分钟。说明: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。可以选择设定 600nm (或 600nm 以上,如 650nm)作为参比波长(也称参考波长),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.样品中总 SOD 活力的计算

a) 抑制百分率的计算:

参考如下计算公式计算抑制百分率:

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

如果样品没有颜色并且也不含有抗氧化物,则 A 空白对照 2 = A 空白对照 3,此时可以把计算公式简化为如下形式(简化时可以不设置空白对照 3):抑制百分率 = (A 空白对照 1 - A 样品) / (A 空白对照 1 - A 空白对照 2) × 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) SOD 酶活力单位的定义：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) SOD 酶活力的计算公式如下：

待测样品中 SOD 酶活力单位 = 检测体系中 SOD 酶活力单位 = 抑制百分率 / (1 - 抑制百分率) units

d) 如果样品为细胞或组织的匀浆液，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/克血红蛋白或 U/毫克血红蛋白。

本产品仅作科研用途