

超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒-WST-8 法

- 【产品简介】 ◆超氧化物歧化酶(SOD) (EC1. 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)法产生的甲臍染料水溶性差，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^-)反应产生水溶性的甲臍染料，后者在450nm处有最大吸收；SOD可清除 O_2^- ，从而抑制甲臍的形成；反应液颜色越深，说明SOD活性愈低，反之活性越高。

【货 号】 TC1003

【规 格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mLx1瓶	4℃	
试剂一	液体 8mLx1瓶	4℃	
试剂二	液体uLx2支	4℃	临用前离心或甩几下使试剂落入底部，再加1.2mL蒸馏水充分溶解，可-20℃冻装保存(尽量避免反复冻融)。
试剂三	液体1.1mLx1支	4℃	
试剂四	液体 10mLx1瓶	4℃	

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

【操作步骤】 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：直接检测或者用提取液稀释；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℃)，或可放在25℃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 (uL)	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后，于450nm 处测定各管吸光值A。				

注意：空白管一批实验只需要各做1-3孔，测定孔每样做至少一个，样本对照孔视情况而定(样本有颜色或有浊度差异等干扰因素时需每样都做)，样本间物理性状差异不大(或是样本稀释后差异不大)时可以随机挑选1-3个样本做，计算时取平均值用)，但是做预试时同一样本的不同浓度最好都做相应的对照孔。(样本每样都做测定空白孔时，试剂能做的样本数减半)

3、结果计算：

①抑制百分率的计算：

抑制百分率=[(A空白管1-A空白管2)-(A样本管-A样本对照管*)]/(A空白管1-A空

白管2) × 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20uL增至50uL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。

②SOD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:

$$\begin{aligned}\text{SOD活性 (U/g鲜重)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D\end{aligned}$$

b. 按样本蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned}\text{SOD活性 (U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) = \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

c. 按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\text{SOD活力 (U/10}^4\text{cell)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D\end{aligned}$$

d. 按液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{SOD活性 (U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div V_1 \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D\end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL; 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

- 【注意事项】**
- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
 - 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。