

总超氧化物歧化酶(SOD)活性试剂盒(WST-1 法)

Total Superoxide Dismutase(SOD) Assay Kit(WST-1)

使用说明书

◆货号及规格:

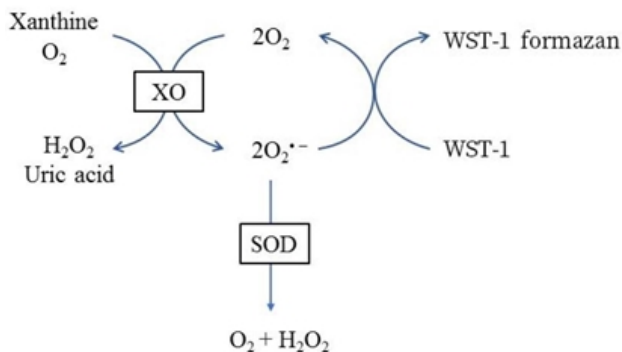
目录编号	包装规格
C210-01	100T

试剂盒组分	C210-01
SOD 样品制备液	50mL
SOD 检测缓冲液	50mL
WST-1	800uL
酶溶液	100uL
反应启动液(40X)	60uL

◆**储存条件:** 4℃运输, -20℃避光保存, 有效期一年, 尽量避免反复冻融。

◆产品介绍:

超氧化物歧化酶(SOD)能够催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)歧化, 生成过生成过氧化氢(H_2O_2)和单质氧气(O_2), 是一种重要的抗氧化酶。目前有许多间接或者直接测定 SOD 的方法, 其中 NBT(氮蓝四唑)法由于使用方便而被广泛使用, 但是, NBT 法有几个缺点, 例如生成的染料水溶性差, 而且会和黄嘌呤氧化酶的还原型发生反应。虽然 Cytochrome C 法也常被用来做 SOD 检测, 但它和超氧化物反应过于剧烈, 不能测定低水平的 SOD。目前测定 SOD 比较先进的方法包括 WST-1 法和 WST-8 法, 本试剂盒采用了目前测定 SOD 方法中稳定性和灵敏度较好的 WST-1 法。使用了易溶于水的噻唑盐: WST-1(2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯基)-2 氢-四唑盐,二钠盐), 能够和超氧阴离子反应生成水溶性的染料, 因此可以简便地进行 SOD 的检测。WST-1 与超氧阴离子反应的剧烈程度比 Cytochrome C 小 70 倍; 因此, 它的检测灵敏度非常高, 并且能够通过将样品用 Buffer 稀释, 使背景的吸光度最小化。WST-1 不会和黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO)的还原型发生反应, 因此, 能够检测 SOD 100%的抑制率。WST-1 被超氧阴离子还原的比率与黄嘌呤氧化酶的活性线性相关, 并且会被 SOD 所抑制(见下图)。因此, SOD 或者 SOD 类似物的 IC50(50%的抑制浓度)就能用比色法来测定。原理如下:



WST-1 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。同时 WST-1 法测定 SOD 酶活力时, 最大抑制百分率可以接近 100%, 并且可以不受一些常见的干扰因素的干扰, 使检测效果比其它的一些常见方法显著改善。

本试剂盒的性能优于同类产品总 SOD 活性检测试剂盒(NBT 法)。本产品的用途与同类产品总 SOD 活性检测试剂盒(NBT 法)相同, 等量 SOD 导致的吸光度变化值显著大于 NBT 法, 线性范围更宽。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。

本试剂盒的检测不受样品中过氧化氢的干扰。很多细胞和组织样品中含有内源性的过氧化氢, 会干扰 SOD 的检测。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、血清等生物样品中的 SOD 活性。

◆使用方法:

一、样品的准备:

1. 细胞样品的准备: 对于贴壁细胞, 吸净细胞培养液, 用 $4^{\circ}C$ 或冰浴预冷的 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, $600 \times g$ 离心 5 min 收集细胞, 用 $4^{\circ}C$ 或冰浴预冷的 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。 $4^{\circ}C$ 约 $12,000 \times g$ 离心 3-5 min, 取上清作为待测样品。
2. 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, 加入 $4^{\circ}C$ 预冷的 PBS 在 $4^{\circ}C$ 或冰浴进行

匀浆(可以使用玻璃匀浆器或各类常见电动匀浆器)。随后匀浆液 12000xg, 4°C离心 3-5 min, 取上清液作为待测样品。

3. 血浆或红细胞样品的准备: 用抗凝管收集血液, 颠倒混匀。600xg, 4°C离心 10 min, 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上述步骤 1 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。
4. 上述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。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, 该活力范围仅作为初步的参考)。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。
5. 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。例如小鼠肝脏组织 10%匀浆液(组织和匀浆液的重量比为 1:10)上清, 通常需要稀释 10-100 倍。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。

二、试剂盒的准备工作:

1. WST-1/酶工作液的配制: 按照每个反应 160 μ L 的体积配置适量的 WST-1/酶工作液。均匀混合 151 μ L 的 SOD 检测缓冲液、8 μ L WST 和 1 μ L 酶溶液, 即可配置成 160 μ L WST-1/酶工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量, 配置适量的 WST-1/酶工作液。具体配置方法可以参考下表。配制好的 WST-1/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: 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。

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

2. 反应启动液的配制: 把试剂盒中的反应启动液(40 \times)融解后混匀, 按照每 1 μ L 反应启动液(40 \times)加入 39 μ L SOD 检测缓冲液的比例进行稀释, 混匀后即为反应启动工作液。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。
3. (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: 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 20 μ L 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。

三、样品测定:

1. 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: 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	20 μ L	—	—	20 μ L
SOD 检测缓冲液	—	20 μ L	40 μ L	20 μ L
WST-1/酶工作液	160 μ L	160 μ L	160 μ L	160 μ L
反应启动工作液	20 μ L	20 μ L	—	—

*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。

2. 37 $^{\circ}$ C 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。
3. 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。

四、样品中总 SOD 活力的计算:

1. 抑制百分率的计算:

参考如下计算公式计算抑制百分率:

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

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:

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

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。

2. 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：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。

3. SOD 酶活力的计算：

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

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

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

4. 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。

五、其他 SOD 酶活力计算的参考方案：

1. 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。
2. SOD 酶活力的动力学检测：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。通常在步骤三第 1 步后可以在 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：

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-70°C可保存 1 个月。需注意反复冻融会导致 SOD 部分失活。
2. 细胞或组织等样品制备时不能采用含有 Triton X-100 等去垢剂的溶液，否则会干扰本试剂盒的检测。

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。酶溶液有时会被分成两层，因此忽略离心混匀步骤会导致实验结果不准确。
5. 为提高实验准确性，建议每个样品进行复孔实验
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，严禁用于临床诊断或药品等用途。

=====

