超氧化物歧化酶(SOD)—WST-8 法活性测定试剂盒说明书

（分光法 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)法产生的甲臜染料水溶性差，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臜染料，后者在 450nm 处有最大吸收；SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$，从而抑制甲臜的形成；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℃保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体μL×3 支	4℃保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部，每支分别加 1.1 mL 蒸馏水充分溶解，4℃保存。
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
试剂四	粉剂×5 支	4℃保存	临用前甩几下，使粉剂落到底部，每支加 **0.1mL** 试剂五振荡或超声**溶解后**，再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用（务必加 **0.1mL** 试剂五溶解后再加水），一周内用完。
试剂五	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、可调式移液器、研钵。

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 4ºC 或冰浴进行匀浆(或用各类常见匀浆器)。4ºC×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；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 测定前将试剂一、三和四 25℃水浴 5min 以上。

③ 试剂四每次加样前**务必**混匀，保证试剂的均一性。

④ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

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	280	280	280	280
试剂二	60		60	
蒸馏水		60	60	120
样本	60	60		
试剂三	30	30	30	30
试剂四	320	320	320	320
充分混匀，室温（25℃）**避光**静置 30min（准确时间）后，于 450nm 测定各管吸光值 A。				

五、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 60μL 增至 120μL 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藕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：

SOD 活性(U/g 鲜重)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V2]÷(W×V1÷V)×D

=12.5×抑制百分率÷(1-抑制百分率)÷W×D

b.按样本蛋白浓度计算：

SOD 活性(U/mg prot)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V2]÷(V1×Cpr)×D

=12.5×抑制百分率÷(1-抑制百分率)÷Cpr×D

c.按细胞数量计算：

SOD 活力(U/10^4 cell)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率) ×V2]÷(500×V1÷V)×D

=0.025×抑制百分率÷(1-抑制百分率)×D

d.按液体体积计算：

SOD 活性(U/mL)=[抑制百分率÷(1-抑制百分率)×V2]÷V1×D

=12.5×抑制百分率÷(1-抑制百分率)×D

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.06mL； V2---反应体系总体积，0.75mL；

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。