

3. SOD活性的计算：

请根据提供的计算公式计算每个样品的SOD活性。如果样品之间差异不大，建议可以先做1个样品摸索条件，找到50%抑制率左右的2个样品点的稀释倍率，其它样品均按照同样的稀释倍率处理，每个样品只需要做2个稀释倍率即可，可以多做样品。如果测定的2个样品点的抑制率不在50%左右，则需要重新摸索条件。例如：测得的2个抑制率分别为60%，75%，则需要进一步稀释样品。反之，则需要增加浓度。

可以测定样品组织蛋白中的SOD活性，用蛋白质定量试剂盒测定样品中的蛋白质含量后换算成U/mg即可，但要注意，蛋白质定量的方法有很多种，且不同公司之间质量可能有较大的差异，有可能会带来一定的误差。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1 1											
B	Sample 1 1/5											
C	Sample 1 1/5 ²											
D	Sample 1 1/5 ³	Sample 2		Sample 3				Sample 4				
E	Sample 1 1/5 ⁴											
F	Sample 1 1/5 ⁵											
G	Sample 1 1/5 ⁶											
H	blank 1	blank 2	blank 3									

图7. 以上样品孔和空白孔是按照96孔板的排列
注意：可以根据自己样品的情况制订稀释倍率。

九. “1 Unit SOD” 的定义

20 μl样品溶液中能够抑制50%的WST[®]-1和超氧阴离子的还原反应所需的酶的量。

十. Mn-SOD活性的测定

Mn-SOD活性可以通过向样品溶液中加入氰化钾(终浓度: 1 mmol/l; 文献4) 或diethyldithiocarbamate(终浓度: 1 mmol/l; 文献5) 测得。这些试剂可以抑制Cu, Zn-SOD和胞外SOD的活性。

十一. 干扰物质

表2. 列出了一些干扰物质的干扰浓度。如果样品中含有这些物质，请稀释样品至干扰浓度以下。由于2-巯基乙醇和二巯苏糖醇的存在会使O.D.值显著增加，所以如果样品中含有这些物质请将其去除。

表2. SOD检测中常见干扰物质的干扰浓度

表面活性剂	
SDS	0.05%
Tween20	0.5%
NP-40	0.5%
Triton X-100	0.2%
溶剂	
Ethanol	25%
DMSO	5%
还原剂	
Glutathione(还原型)	1.25 mmol/l
Ascorbic acid	0.1 mmol/l
其他	
EDTA	2 mol/l
BSA	1%(W/V)

关联产品：

谷胱肽检测 T419 总谷胱肽测定试剂盒 100次

表3. 生物样本的SOD活性

Total-SOD	
红细胞	10845 U/ml of blood
血浆	335 U/ml of blood
大鼠心脏	15712 U/g (湿重)
大鼠肝脏	142907 U/g (湿重)
HeLa 细胞	73 U/1x10 ⁷ cells
HL 60细胞	226 U/1x10 ⁶ cells

十二. 参考文献

1. J.M.McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244, 6049.
2. S.Goldstein and G. Czapski, *Free Rad. Res. Comms.*, **1991**, 12, 5.
3. R. H. Burdon, V. Gill, and C. Rice-Evans, *Free Rad. Res. Comms.*, **1993**, 18, 369.
4. M. L. Salin, E.D. Day, Jr. J. D. Crapo, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1978**, 187, 223.
5. R. E. Heikkila, F. S. Cabbat and G. Cohen, *J. Biol. Chem.*, **1976**, 251, 2182.

东仁化学科技(上海)有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

上海
上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座
邮编：200030
电话：800-988-0083
网址：http://www.dojindo.cn

北京
北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室
邮编：100029
电话：010-8225-1765
E-mail: info@dojindo.cn
修订日期：2013年8月

超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒-WST[®] 操作说明书 (100孔)

*本试剂盒(货号: S311) 只能用于检测SOD的活性,不能用于检测超氧阴离子(O₂⁻)

本说明书提供了下列两种检测方法。

方法1 (检测SOD抑制率法)：100孔可以检测18-29个样品。 方法2 (检测SOD活性法)：100孔可以检测4-13个样品。两种方法的操作和实验结果准确度都有区别，请根据您的具体情况和实验准确度要求选择。如有疑问，请按照说明书下方的联系方式咨询技术人员。

目录

一. 检测机理	1	七. 工作液的制备	2
二. 试剂盒内容	1	八. 操作步骤	2
三. 贮藏条件	1	检测SOD抑制率法	2
四. 所需设备	1	检测SOD活性法	3
五. 注意事项	2	九. “1 Unit SOD” 的定义	4
六. 样品制备	2	十. Mn-SOD活性的测定	4
红细胞或血浆	2	十一. 干扰物质	4
组织	2	十二. 参考文献	4
细胞	2		

一. 检测机理

超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种重要的抗氧化酶，它可以催化超氧阴离子(O₂⁻) 的歧化反应，生成过氧化氢和单质氧。目前有很多直接或间接地测量SOD活性的方法，在这些方法中，使用硝基蓝四唑(氮蓝四唑nitroblue tetrazolium, 简称NBT) 的一种间接测量方法因其便捷、简单的使用方法而被广泛应用。但是NBT法存在一些缺点，例如生成的染料(Formanzan dye) 的水溶性较低，会和黄嘌呤氧化酶的还原型发生反应等问题。SOD检测试剂盒-WST[®]提供了更为简便的检测SOD的方法，它是利用同仁化学研究所研发的高度水溶性四唑盐WST[®]-1 (2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸基)-2-氢-四唑盐,二钠盐)，能与超氧阴离子(O₂⁻) 反应生成一种水溶性的染料。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，即红色区域SOD反应优先发生，SOD反应完后蓝色区域WST[®]-1反应才能发生)。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(同仁化学研究所专利)。

WST[®]：WST是日本同仁化学研究所的注册商标。

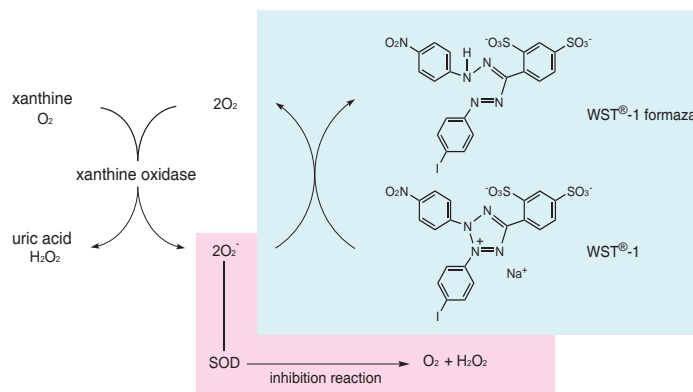


图1. SOD活性检测机理

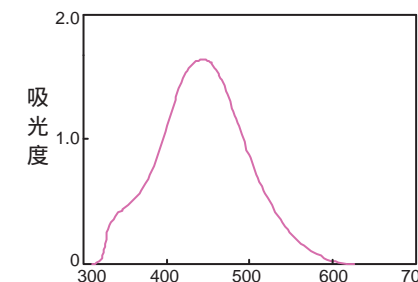


图2. WST[®]-1 甲腈的吸收光谱图

在440 nm处吸光度的变化对应于超氧阴离子浓度的变化，故可在440 nm下通过检测吸光度计算SOD的活性。

二. 试剂盒内容

- WST[®] solution 1 ml x 1瓶
- Enzyme solution 20 μl x 1瓶
- Buffer solution 11 ml x 2瓶
- Dilution buffer 10 ml x 1瓶

三. 贮藏条件

请在0-5 °C下保存。试剂盒在0-5 °C下可保存一年。在4 °C下，WST[®]工作液可保存2个月，酶工作液可保存3周。请避光保存WST[®] solution和WST[®]工作液。

四. 所需设备

- 酶标仪 (450 nm)
- 培养箱、96孔板
- 2-20 μl和20-200 μl的可调式移液器、多通道移液器

五. 注意事项

- 请使用试剂盒中附带的Dilution buffer或生理盐水稀释样品。
- Enzyme solution被分成两层，因此忽略了移液器混合的步骤会导致实验结果的不准确。
- 为提高实验准确性，建议每个样品进行复孔实验。
- 酶工作液加入后会立即有超氧化物生成，请用多通道移液器来加酶工作液以缩短时间，减少各孔间误差。

六. 样品制备

红细胞或血浆

1. 取2-3 ml抗凝处理后的血液 (如最终浓度约为10 U/ml 肝素钠), 0-5 °C下, 600 g 离心10分钟。
 2. 移去上清液作为血浆样品。
 3. 加等量的生理盐水 (相当于移去的血浆量) 至沉淀中, 制成悬液。取0.4 ml加入到10 ml的玻璃离心管中, 加生理盐水至10 ml, 0-5 °C下, 600 g 离心10分钟。
 4. 弃上清液, 加入等量的生理盐水至沉淀中, 制成悬液。0-5 °C下, 600 g离心10分钟。重复此步骤1次。
 5. 在沉淀中加入4.0 ml蒸馏水, 制成悬液。加入1 ml乙醇和0.6 ml氯仿。
 6. 将混合后的液体, 盖紧盖子, 0-5 °C下用振荡器强烈震荡15分钟。
 7. 在0-5 °C下, 将混合液600 g, 离心10分钟, 随后将上层水乙醇层小心移入一支新的试管中。
 8. 取出0.1 ml的水乙醇层, 加入0.7 ml蒸馏水, 制成红细胞样品溶液。
- *如果进行SOD活性检测, 在各稀释梯度的Dilution buffer中需加入乙醇稀释液, 维持0.25%的乙醇体系。

组织 (100 mg)

1. 用生理盐水清洗组织, 尽可能将血液去除。用纸巾将组织上的水分吸干, 然后称重。
2. 加入400-900 μl蔗糖缓冲液 (0.25 mol/l 蔗糖, 10 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, pH 7.4), 用Teflon匀浆机将样品匀浆。如果必要的话, 用冰浴器将样品超声粉碎, (60 W, 0.5秒间隔, 15分钟)。
3. 匀浆后的样品, 10,000 g离心60分钟, 将上清液移入新的试管中, 制成样品溶液。

细胞 (HeLa: 1x10⁷个细胞, HL60: 1.2x10⁷个细胞)

1. 用刮刀刮下细胞。0-5 °C下, 2,000 g 离心10分钟, 弃上清。
2. 用1 ml PBS洗净细胞, 0-5 °C, 2,000 g 离心10分钟, 弃上清。重复此步骤一次。
3. 用匀浆器将细胞破损。
4. 加入1 ml 新的PBS。如果必要的话, 在冰浴器上用超声降解细胞裂解物 (60 W, 0.5秒间隔, 15分钟)。
5. 0-5 °C下, 10,000 g离心15分钟, 将上清液移入新的试管中, 制成样品溶液。

七. 工作液的制备 : (供1块96孔板用)

WST®工作液

用19 ml的Buffer solution稀释1 ml WST® solution.

酶工作液

将装有Enzyme solution的试管离心5秒。用移液器混匀*, 用2.5 ml的Dilution buffer稀释15 μl Enzyme solution.

* Enzyme solution被分成两层, 因此忽略了移液器混合的步骤会导致实验结果的不准确。

八. 操作步骤

1. 检测SOD抑制率的操作步骤 : (请见表1, 图3及图4)。

- 1) 样品孔和空白孔2中分别加入20 μl 样品溶液, 在空白孔1和空白孔3中分别加入20 μl ddH₂O (双蒸水)。
- 2) 每孔分别加入200 μl WST®工作液, 混匀。
- 3) 空白孔2和空白孔3中分别加入20 μl Dilution buffer。
- 4) 样品孔和空白孔1中分别加入20 μl 酶工作液, 充分混合*。
- 5) 37 °C 培养箱中培养20分钟。
- 6) 用酶标仪在450 nm处读数。
- 7) 按照下面的公式计算SOD的抑制率%。

$$\text{SOD抑制率\% (对WST®-1的抑制率)} = \frac{[(A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白3}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白2}})]}{(A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白3}})} \times 100$$

*酶工作液加入后会立即有超氧化物生成, 请用多通道移液器来加酶工作液以缩短时间, 减少各孔间的误差。

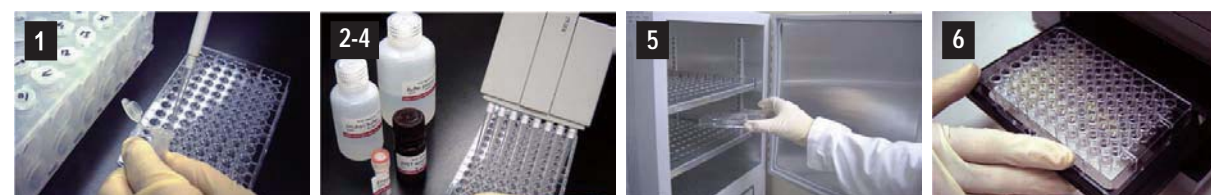
表1. 孔板中各孔的溶液用量

	样品	空白 1	空白 2	空白 3
样品溶液	20 μl	-	20 μl	-
ddH ₂ O	-	20 μl	-	20 μl
WST® 工作液	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Dilution buffer	-	-	20 μl	20 μl
酶工作液	20 μl	20 μl	-	-

空白1: 不含抑制剂的空白对照;
空白2: 样品空白对照;
空白3: 试剂空白对照;

*如果样品是组织或样品溶液的颜色较深, 必须测定每个稀释样品空白2的值并扣除。

图3. SOD检测试剂盒 - WST®操作示意图



1) 各孔中加入样品溶液或双蒸水。 2-4) 各孔中加入WST®工作液, 然后加Dilution buffer或酶工作液。 5) 在37 °C培养20分钟。 6) 用酶标仪在450 nm处读数。

如果具体实验需要做标准曲线, 则需准备SOD标准品, 按以下操作进行。

按照下列顺序, 用Dilution buffer稀释SOD制备SOD标准溶液。

200 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml, 20 U/ml, 10 U/ml, 5 U/ml, 1 U/ml, 0.1 U/ml, 0.05 U/ml, 0.01 U/ml, 0.001 U/ml

(如果不需要标准品, 标准品的孔可以用来作样品孔用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SOD 200 U/ml	Blank 1	Blank 2	Blank 3								
B	SOD 100 U/ml	SOD 0.05 U/ml	SOD 0.01 U/ml	SOD 0.001 U/ml								
C	SOD 50 U/ml	Sample 1	Sample 7	Sample 13								
D	SOD 20 U/ml	Sample 2	Sample 8	Sample 14								
E	SOD 10 U/ml	Sample 3	Sample 9	Sample 15								
F	SOD 5 U/ml	Sample 4	Sample 10	Sample 16								
G	SOD 1 U/ml	Sample 5	Sample 11	Sample 17								
H	SOD 0.1 U/ml	Sample 6	Sample 12	Sample 18								

图4: 以上样品孔和空白孔是按照96孔板的排列

抑制曲线

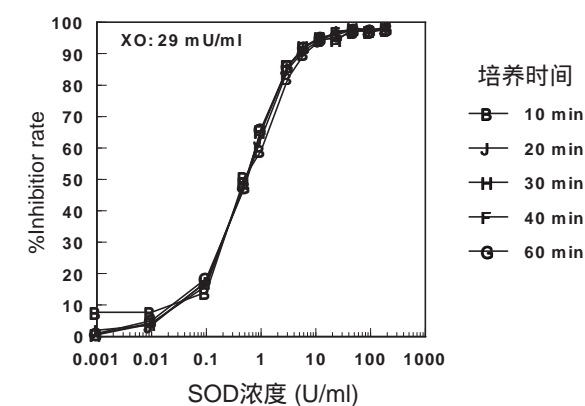


图5. 不同培养时间WST®-1检测得出的抑制曲线

2. 检测SOD活性的操作步骤 :

操作步骤与SOD抑制率操作相似, 区别是需事先将样品稀释7个梯度 (图6), 然后参考抑制率操作步骤和图7进行。

请按照以下步骤用Dilution buffer或生理盐水稀释样品溶液。

***如果您的样品抑制率没有达到50%以上, 请增加细胞数量或者提高样品溶液的浓度。**

稀释比率: 1, 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶ (见下图)

图6. 样品溶液的制备

