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(O_2^-)**

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

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(O_2^-) 的歧化反应，生成过氧化氢和单质氧。目前有很多种直接或间接地测量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–(2,4–二磺酸苯基)–2氢–四唑盐,二钠盐)，能与超氧阴离子(O_2^-) 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IC_{50} (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。

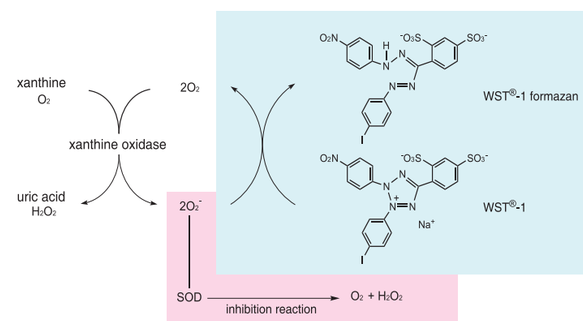


图1. SOD活性检测机理

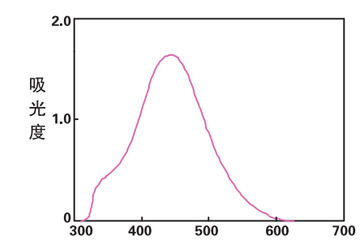


图 2. WST®–1 甲臜的吸收光谱图

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×1瓶
- Enzyme Solution　20 μl×1瓶
- Buffer Solution　11 ml×2瓶
- Dilution Buffer　10 ml×1瓶

三. 贮藏条件

请在0- 5℃下保存。试剂盒在0- 5℃下可保存一年。在4℃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

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。

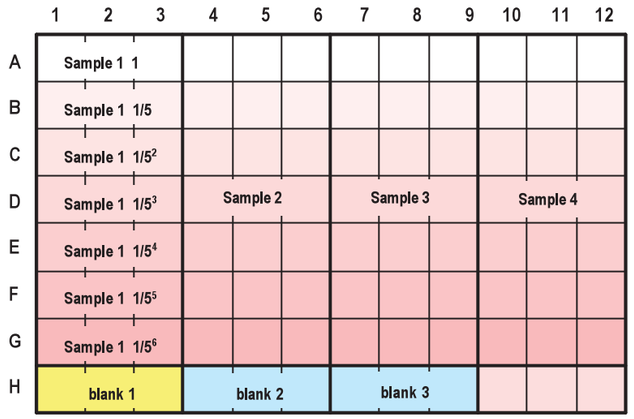


图7. 以上样品孔和空白孔是按照96孔板的排列

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Diethldithiocarbamate (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-巯基乙醇和二硫苏糖醇的存在会使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)

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/1x10⁷ cells
HL 60细胞	226 U/1x10⁸ cells

关联产品:

G263	GSSG/GSH Quantification Kit II
T419	Total Glutathione Quantificaton Kit

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的方式联系我们：

网址：http://www.dojindo.cn　　E-mail: info@dojindo.cn

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：400-823-9388

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

2018年9月

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)，在0-5°C下，600×*g* 离心10 min。
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，在0-5°C下，600×*g* 离心10 min。
4. 弃上清液，加入等量的生理盐水至沉淀中，制成悬液。在0-5°C下，600×*g*离心10 min。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， 在0-5°C下用振荡器强烈震荡15 min。
7. 在0-5°C下，将混合液在600×*g*，离心10 min，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 s间隔，15 min)。
3. 匀浆后的样品，在10,000×*g*离心60 min，将上清液移入新的试管中，制成样品溶液。

细胞 (HeLa: 1×10^7个细胞, HL60: 1.2×10^7个细胞)

1. 用刮刀刮下细胞。在0-5°C下，2,000×*g* 离心10 min，弃上清。
2. 用1 ml PBS洗净细胞，在0-5°C，2,000×*g* 离心10 min，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 s间隔，15 min)。
5. 在0-5°C下，在10,000×*g*离心15 min，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 s。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超纯水。
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) 在37°C培养箱中培养20 min。
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%。

$$\text{SOD抑制率\% (对WST®-1的抑制率)} = [(A_{空白1}-A_{空白3}) - (A_{样品}-A_{空白2})] / (A_{空白1}-A_{空白3})\times100$$

*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。

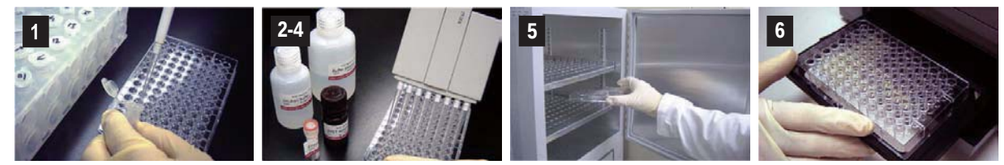
表1. 孔板中各孔的溶液用量

	样品	空白 1	空白 2	空白 3
样品溶液	20 μl	-	20 μl	-
超纯水	-	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超纯水。　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 min。　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
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

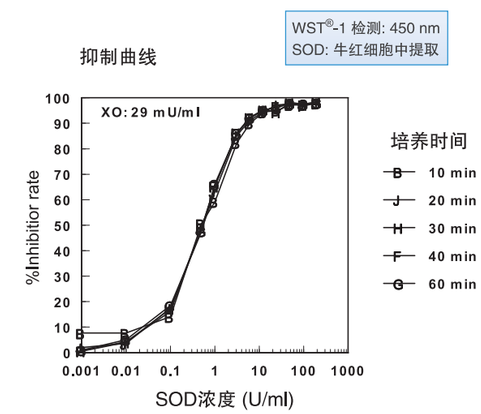


图5. 不同培养时间WST®–1检测得出的抑制曲线

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，$1/5^2$，$1/5^3$，$1/5^4$，$1/5^5$，$1/5^6$ (见下图)

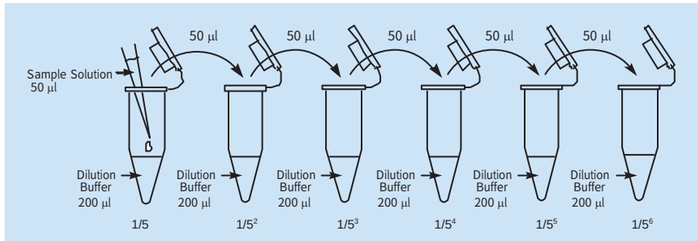



图6. 样品溶液的制备