

超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒—WST

说明书修订日期: 2019.07.23

Cat number: KGT00150-2/KGT001100-2

Store at 2-8°C for 12 months, 避光

For Research Use Only

本试剂盒只能用于检测 SOD 的活性, 不能用于检测超氧阴离子 (O_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 (O_2^-) 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 (Formazan 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, 即红字区域 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 IC_{50} (50%的抑制浓度) 就能用比色法来测定。

二. 试剂盒内容

组份	KGT00150-2 (50 孔)	KGT001100-2 (100 孔)
WST solution	0.5ml	1ml
Enzyme solution	10 μ l	20 μ l
Buffer solution	11ml	22ml
Diltion buffer	5ml	10ml

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): 50 孔可以检测 9-15 个样品; 100 孔可以检测 18-29 个样品。

方法 2 (检测 SOD 活性法): 50 孔可以检测 2-7 个样品; 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。

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, Enzyme 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 (450nm) -

培养箱、96 孔板

2-20 μ l 和 20-200 μ l 的可调式移液器、多通道移液器

五. 注意事项

1. 请使用试剂盒中附带的 Dilution buffer 或生理盐水稀释样品。
2. 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。
3. 为提高实验准确性, 建议每个样品进行复孔实验。
4. 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工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 2-3ml 抗凝处理后的血液 (如最终浓度约为 10 U/ml 肝素钠), 0-5 $^{\circ}$ C 下, 600g 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 0.4ml 加入到 10ml 的玻璃离心管中, 加生理盐水至 10ml, 0-5 $^{\circ}$ C 下, 600g 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 $^{\circ}$ C 下, 600g 离心 10 分钟。重复此步骤 1 次。
5. 在沉淀中加入 4.0ml 蒸馏水, 制成悬液。加入 1ml 乙醇和 0.6ml 氯仿。
6. 将混合后的液体, 盖紧盖子, 0-5 $^{\circ}$ C 下用振荡器强烈震荡 15 分钟。
7. 在 0-5 $^{\circ}$ C 下, 将混合液 600g, 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 0.1ml 的水乙醇层, 加入 0.7ml 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 (100mg)

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 μ l 蔗糖缓冲液 (0.25mol/l 蔗糖, 10mmol/l HEPES, 1mmol/l EDTA, pH 7.4), 用 Teflon 匀浆机将样品匀浆, 如果必要的话, 用沐浴器将样品超声粉碎, (60W, 0.5 秒间隔, 15 分钟)。
3. 匀浆后的样品, 10,000g 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: 1×10^7 个细胞, HL60: 1.2×10^7 个细胞)

1. 用刮刀刮下细胞。0-5 $^{\circ}$ C 下, 2,000g 离心 10 分钟, 弃上清。
2. 用 1ml PBS 洗净细胞, 0-5 $^{\circ}$ C 下, 2,000g 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 1ml 新的 PBS。如果必要的话, 在沐浴器上用超声降解细胞裂解物 (60W, 0.5 秒间隔, 15 分钟)。
5. 0-5 $^{\circ}$ C 下, 10,000g 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 19ml 的 Buffer solution 稀释 1ml 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 2.5ml 的 Dilution buffer 稀释 15 μ l 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）。

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

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

*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工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 μ l	-	20 μ l	-
ddH ₂ O	-	20 μ l	-	20 μ l
WST 工作液	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Dilutionbuffer	-	-	20 μ l	20 μ l
酶工作液	20 μ l	20 μ l	-	-

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。

如果具体实验需要做标准曲线，则需准备 SOD 标准品，请按以下操作进行。

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)。

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（稀释比率如下），然后参考抑制率操作步骤进行。

请按照以下步骤用 Dilution buffer 或生理盐水稀释样品溶液。

稀释比率：1, 1/5, 1/5², 1/5³, 1/5⁴, 1/5⁵, 1/5⁶

*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。

3. SOD 活性的计算:

请根据计算公式(请致电025-84989809或邮箱keygenbio@keygentec.com.cn详询)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 2 个抑制率分别 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。

九. “1 Unit SOD” 的定义

20 μ l 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氧化钾(终浓度: 1mmol/l)或 diethyldithiocarbamate(终浓度: 1mmol/l)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

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 OD 值显著增加,所以如果样品中含有这些物质请将其去除。

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)	1.25mmol/l
Ascorbic acid	0.1mmol/l
其他	
EDTA	2mol/l
BSA	1%(w/v)

常见生物样本的 SOD 活性见下表

样本类型	Total-SOD
红细胞	10845U/ml of blood
血浆	335U/ml of blood
大鼠心脏	15712U/g(湿重)
大鼠肝脏	142907U/g(湿重)
HeLa 细胞	73U/1×10 ⁷ cells
HL 60 细胞	226U/1×10 ⁸ cells

