



## CuZn/Mn-SOD 活性检测试剂盒(WST-8 法)

版本号: V1.1-202206

### 一、产品规格

产品组成	BLGE294-100T
SOD 检测缓冲液	70mL
WST-8	800 $\mu$ L
酶溶液	100 $\mu$ L
反应启动液 (40X)	60 $\mu$ L
Cu/Zn-SOD 抑制 A	500 $\mu$ L
Cu/Zn-SOD 抑制 B	500 $\mu$ L
说明书	1 份

### 二、基本信息

WST-8 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-8 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。一个试剂盒共可以进行 100 次检测。

### 三、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. Cu/Zn-SOD 抑制剂 A 对人体有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
3. 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。
4. 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。此时尽管样品没有颜色, 如果设置了使用说明中的空白对照 3, 就可以消除样品中的抗氧化物的干扰。
5. 为了您的健康安全, 请穿戴实验服且佩戴一次性手套进行操作。



## 四、储存运输

-20°C 保存，半年有效。S0103-2 WST-8 溶液需避光保存。

## 五、产品应用

### 1. 样品的准备：

a. 细胞样品的准备：收集细胞，用 4°C 或冰浴预冷的 PBS 或生理盐水洗涤 1-2 遍。沉淀用预冷的 PBS 在 4°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 4°C 离心，取上清作为待测样品。

b. 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°C 或冰浴预冷的 PBS 在 4°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 4°C 离心，取上清作为待测样品。

c. 血浆或红细胞样品的准备：用抗凝管收集血液，颠倒混匀。4°C 600g 离心 10 分钟，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步骤 1a 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。

d. 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 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。

e. Cu/Zn-SOD 的抑制(测定 Mn-SOD 或 Cu/Zn-SOD 时选做)：将 Cu/Zn-SOD 抑制剂 A 和经适当稀释的样品或标准品按 1:24 的体积比(如 4 $\mu$ l +96 $\mu$ l)，在离心管内或 96 孔板中混合好，37°C 孵育 1 小时；取 20 微升 Cu/Zn-SOD 抑制剂 B 加入到 780 微升水中，混匀，即进行 40 倍稀释。然后将已经 40 倍稀释的 Cu/Zn-SOD 抑制剂 B 和上述混合物再按 1:25 的体积比混合均匀(如 4 $\mu$ l+100 $\mu$ l)，37°C 再孵育 15 分钟。随后即可进行步骤 3a，或暂时 4 度或冰浴保存。样品处理后宜当日使用，并尽量在处理 后尽快进行后续检测。

注 1：稀释后的 Cu/Zn-SOD 抑制剂 B 宜当天使用，多余的已稀释的 Cu/Zn-SOD 抑制剂 B 可以直接丢弃。注 2：本试剂盒中提供的 Cu/Zn-SOD 抑制剂 A 和抑制剂 B 用于待测样品中 Cu/Zn-SOD 酶活性的抑制；不宜用于添加到 培养的细胞、组织中，或注射到活体动物中以抑制 Cu/Zn-SOD。

### 2. 试剂盒的准备工作：

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



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

注意：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。

b. 反应启动工作液的配制：把试剂盒中的反应启动液(40X)融解后混匀，按照每 1μl 反应启动液(40X)加入 39μl SOD 检测缓冲液的比例进行稀释，混匀后即反应启动工作液。根据待测样品(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。 c. (可选做)SOD 标准品准备：需自备 SOD 标准品，用本试剂盒提供的稀释液将 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 微升，参考样品进行检测。

说明：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。

### 3. 样品测定：

a. 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。注意：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	空白对照 1	空白对照 2	空白对照 3
待测样品	20 μL	-	-	20 μL
SOD 检测缓冲液	-	20 μL	40 μL	20 μL
WST-8/酶工作液	160 μL	160 μL	160 μL	160 μL
反应启动液	20 μL	20 μL	-	-

\*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没有必要设置空白对照 3。

b. 37°C 孵育 30 分钟。

说明：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。

c. 在 450nm 测定吸光度。如无 450nm 滤光片，可以使用 420-480nm 的滤光片。可以使用大于 600nm 的波长作为参考波长进行 双波长测定。



#### 4. 样品中总 SOD 活力的计算

a. 抑制百分率的计算：参考如下计算公式计算抑制百分率：抑制百分率 =  $[(A \text{ 空白对照 } 1 - A \text{ 空白对照 } 2) - (A \text{ 样品} - A \text{ 空白对照 } 3)] / (A \text{ 空白对照 } 1 - A \text{ 空白对照 } 2) \times 100\%$  如果没有设置空白对照 3，则可以把计算公式简化为：抑制百分率 =  $(A \text{ 空白对照 } 1 - A \text{ 样品}) / (A \text{ 空白对照 } 1 - A \text{ 空白对照 } 2) \times 100\%$  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。

b. SOD 酶活力单位的定义：在上述黄嘌呤氧化酶耦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)。

注意：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。

SOD 酶活力的计算公式如下：待测样品中 SOD 酶活力单位 = 检测体系中 SOD 酶活力单位 =  $\text{抑制百分率} / (1 - \text{抑制百分率}) \text{ units}$  例如，当抑制百分率为 50% 时，待测样品中 SOD 酶活力单位 =  $50\% / (1 - 50\%) \text{ units} = 1 \text{ unit}$ ；当抑制百分率为 60% 时，待测样品中 SOD 酶活力单位 =  $60\% / (1 - 60\%) \text{ units} = 1.5 \text{ units}$ 。

d. 如果样品为细胞或组织的匀浆液，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/克血红蛋白或 U/毫克血红蛋白。附 1：SOD 酶活力计算的参考方案：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。

附：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 3a 后可以 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计算出抑制百分率：抑制百分率 =  $[(\text{斜率空白对照 } 1 - \text{斜率空白对照 } 2) - (\text{斜率样品} - \text{斜率空白对照 } 3)] / (\text{斜率空白对照 } 1 - \text{斜率空白对照 } 2) \times 100\%$ 。

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。

**本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断！**