总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(NBT 核黄素微板法)

产品简介:

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)是含金属辅基的酶，能催化超氧化物阴离子发生歧化作用，生成过氧化氢(H_2O_2)和氧气(O_2)，是生物体内一种重要的抗氧化酶，由于超氧自由基是不稳定的的自由基，寿命极短，SOD 活性一般用间接方法测定，并利用各种呈色反应来测定 SOD 活力，其中显色剂有 NBT(唑蓝四氮)、WST-1、WST-8 等。

总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(NBT 核黄素微板法)(Total SuperoxideDismutase Assay Kit with NBT)是一种基于 NBT 的光还原反应，所以又称作 NBT 光还原法，检测原理是在有氧化物质存在下核黄素被光还原，在有氧条件下，被还原的核黄素极易再氧化产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)，$O_2^{\cdot-}$可将氮蓝四唑还原为蓝色的甲腙，后者在 560nm 处有强吸收，而 SOD 可清除超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)，从而抑制了甲腙的形成。于是光还原反应后，反应液蓝色愈深，说明 SOD 活性愈低，反之酶活性愈高，据此通过酶标仪比色分析就可以计算出样品中总超氧化物歧化酶活性水平。本方法是利用 SOD 抑制 NBT 在光照下的还原作用来确定酶活性大小，可用于检测植物、组织、细胞、血清或其它样品中 SOD 活性。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0720 100T	Storage
试剂(A): SOD 提取试剂	2×250ml	RT
试剂(B): Met 缓冲液	20ml	4℃ 避光
试剂(C): NBT 溶液	3ml	4℃ 避光
试剂(D): FD 溶液	3ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 生理盐水或 PBS

2、 电子天平、剪刀、低温冰箱或制冰机、冰袋、匀浆器或研钵、离心机、离心管、小试管、光照培养箱光源或 40W 荧光灯或日光灯、测光仪(照度计)、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考):

1、 样品处理:

①血浆或含红细胞的样品：从待测样品中分理出的血清或血浆不应有溶血，如果含有应去除红细胞后检测，如超过检测范围，用 SOD 提取试剂稀释后检测；血清去除红细胞的

简易方法如下：用抗凝管收集血液，颠倒混匀，取至少 500μl 全血，4℃ 3000r/min 离心 5min，转移上清至另一新的 1ml 离心管中，适量生理盐水稀释后待测，亦可采用红细胞裂解液去除红细胞，如 ACK 红细胞裂解液等。

②组织样品：动物用含有 20U/ml Heparin 的生理盐水(0.9% NaCl containing 20U/ml Heparin)灌流清除血液后获取组织样品，按照每 100mg 组织加入 500μl SOD 提取试剂的比例，用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆，4℃ 4000r/min 离心 10min，取上清液(SOD 粗提液)用于酶活性的测定。

③细胞样品：对于贴壁细胞，由于后续用于酶活性的测定，避免使用胰酶消化细胞，可以使用细胞刮或 EDTA 处理细胞并收集细胞，细胞用无菌的 PBS 或生理盐水洗涤 1 次，按照每 10^6 细胞加入 300~500μl SOD 提取试剂的比例，用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆，4℃ 10000r/min 离心 10min，取上清液(SOD 粗提液)用于酶活性的测定。

④植物样品：准确称取植物材料(果肉或者去叶脉的叶片)0.4g，剪碎，置于 4℃预冷的研钵或匀浆器中，加入预冷 SOD 提取试剂 1ml，低温研磨至匀浆后转移至离心管，用 3ml SOD 提取试剂冲洗研钵或匀浆器并转入离心管，加提取试剂至总体积为 4ml，4℃ 4000r/min 离心 20min，上清液为酶提取液，上清液可用于 SOD 的检测。注意：如果 SOD 酶活性较低，应相应减少提取试剂的总体积，以便提高 SOD 酶的浓度。

⑤上述样品准备完毕后可以用 BCA 法测定蛋白浓度，通常 10~20μg 蛋白的细胞或组织匀浆液样品其中的 SOD 平均活力约 1 个活力单位(不同细胞和组织的差异会比较大，该活力范围仅作为初步的参考)；每种样品准备 20~100μg 蛋白量通常已经足够用于后续检测，根据蛋白浓度和预计的蛋白使用量，用该试剂盒提供的 SOD 提取试剂适当稀释样品，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-20℃冻存，但建议尽量当天完成测定。

2、(选做)准备 SOD 标准品:需自备 SOD 标准品,用本试剂盒提供的 SOD 提取试剂将 SOD 标准品稀释至如下系列浓度：200、100、50、20、10、5、2U/ml，各取 20μl 参考样品进行检测。注意：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、选取合适的光源：在光照培养箱或日光灯下，用光度仪测定光度值为 3500~4000Lx 的适合光照反应的位置，做出标记。

4、配制 NBT 工作液：将 Met 缓冲液与 NBT 溶液按 23:3 的比例混合即可。

5、SOD 加样：参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、光照对照孔、测定孔，在低光强条件下按下表依次加入待测样品和其它各种溶液，加入 FD 溶液后充分混匀。注意：加入 FD 溶液后反应即会开始，在低光强条件下用排枪操作可减小各孔间因加入试剂的时间

先后差异而导致的误差。

加入物(μl)	空白对照孔	光照对照孔	测定孔
SOD 提取试剂	8	8	—
待测样品(上清液)	—	—	8
NBT 工作液	208	208	208
FD 溶液	24	24	24

6、 SOD 测定：混匀，取空白对照孔置于暗处，其他各孔置于 4000Lx 日光下反应 20min，各孔受光情况应一致，温度高时时间可缩短，低时延长；反应结束后，以不照光的空白对照孔调零，用酶标仪测定 560nm 处吸光度。

计算：

SOD 活力单位的定义：以抑制 NBT 光化还原的 50%为一个酶活性单位(U)。

液体中总 SOD 活力(U/ml)=($A_{光照}$ - $A_{测定}$)/(50%×$A_{光照}$×V_T)

组织、细胞匀浆液中总 SOD 活力(U/g)=($A_{光照}$ - $A_{测定}$)×V/(50%×$A_{光照}$×V_T×W)

血液中总 SOD 活力(U/gHb)=($A_{光照}$ - $A_{测定}$)×V×C/(50%×$A_{光照}$×V_T×Hb)

式中：$A_{光照}$=光照对照孔的吸光度

$A_{测定}$=测定孔的吸光度

V=样品液总体积(ml)

V_T=测定时样品所用体积(ml)

W=样品鲜质量(g)

C=1ml/采血量(ml)

Hb=血红蛋白含量(gHb/ml)

注意事项：

1、 上述低温试剂避免反复冻融，以免失效或效率下降。待测样品-70℃可保存 1 个月，需注意反复冻融会导致 SOD 部分失活。

2、 植物中的多酚类物质会引起酶蛋白不可逆沉淀，使酶失去活性，因此在提取 SOD 酶时，必须添加多酚类物质的吸附剂，将多酚物质除去，避免酶蛋白变性失活。SOD 提取试剂含有 PVP 等成分，可有效去除多酚类物质。SOD 提取试剂不够用可以用磷酸钠缓冲液(0.05M,pH7.8)替代。

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。

5、 对于植物样品，研磨处理应迅速，以免 SOD 酶活下降，尽量在冰浴条件下处理。

6、 如果用分光光度计，比色杯光径应为 1cm，加入的上清及试剂量应根据比色杯的最小要求体积而定。
7、 所用离心管或 96 孔板应洁净透明，透光性好。
8、 一般要求各孔受光情况一致，所有反应管应排列在与日光灯灯管平行的直线上。
9、 反应温度控制在 25℃，视酶活性高低适当调整反应时间；温度较高时，光照时间应缩短；温度较低时，光照时间相应延长。
10、 如果无 4000Lx 日光，可 200W 在 10~12cm 处，照射 20min；超净工作台 5cm 处光强约 800~1000Lx，,照射 30~40min；强太阳光下一般光强可达 30000Lx，照射 5~15min，一般不建议直接用太阳光。
11、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
12、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期： 6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTE0190	纤维素酶检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTE0726	总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(邻苯三酚比色法)

