总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(邻苯三酚比色法)

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(四氮唑蓝)、WST-1、WST-8 等。

总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(邻苯三酚比色法)也叫邻/连苯三酚自氧化法或邻/连苯三酚自氧化抑制法，其检测原理是邻苯三酚在碱性条件下，能迅速自氧化，释放出超氧阴离子自由基，进而生成黄色的中间产物；在自氧化过程的初始阶段，黄色产物的积累在滞后 30~45s 后与时间呈线性关系，黄色产物在 325nm 处有强吸收，在有 SOD 存在时，由于 SOD 能催化超氧阴离子自由基与氢离子结合成氧气和过氧化氢，从而阻止了中间产物的积累，因此可根据 SOD 抑制邻苯三酚自氧化能力测定 SOD 的酶活力。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	GCTE0726 50T	GCTE0726 100T	Storage
试剂(A): SOD Assay Buffer	50ml	100ml	RT
试剂(B): 邻苯三酚显色液	5ml	10ml	4℃ 避光
试剂(C): 空白对照液	5ml	10ml	RT
使用说明书	说明书		

自备材料:

1、 蒸馏水、生理盐水或磷酸缓冲液

2、 离心机、离心管、水浴锅或恒温箱、小试管、分光光度计、石英比色杯

操作步骤(仅供参考):

1、 准备样品:

①血浆或含红细胞的样品: 如果测定血浆中 SDO 活性，则从待测样品中分理出血清或血浆，不应有溶血，如果含有红细胞应先 4℃ 3000r/min 离心 5min，转移上清至另一新的离心管中，适量生理盐水稀释后待测，如超过检测范围，用磷酸缓冲液(pH7.8)稀释后再测。如果需要测定红细胞中 SOD 活性，则应取一定体积的新鲜血液或肝素抗凝血，混匀，3000r/min 离心 5min，弃上清，沉淀用 ACK 红细胞裂解液使其充分溶血，3000r/min 离心 5min，上清液即为红细胞 SOD 粗提液。

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 磷酸缓冲液(pH7.8)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 磷酸缓冲液(pH7.8)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，加入预冷磷酸缓冲液(pH7.8) 1ml，低温研磨至匀浆后转移至离心管，用 3ml 磷酸缓冲液冲洗研钵或匀浆器并转入离心管，加总体积至 4ml，4℃ 10000r/min 离心 20min，上清液为酶提取液，可用于 SOD 的检测。

⑤澄清液体样品可取原液直接测定，浑浊液体样品可经 4℃ 4000r/min 离心 15min，再取上清液测定。※注意：如果 SOD 酶活性较低，应相应减少提取液的总体积，以便提高 SOD 酶的浓度。提取液建议使用磷酸缓冲液(50mM pH7.8)，也可以根据需要使用蒸馏水或其他溶液。

⑥样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度，通常 10～20μg 蛋白的细胞或组织匀浆液样品中的 SOD 平均活力约 1 个活力单位左右(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，用相关提取液适当稀释样品；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-20℃冻存，但建议尽量当天完成测定。

2、 邻苯三酚自氧化速率测定：在 25℃左右，于两个离心管中按下表依次加入各试剂。

加入物(ml)	自氧化空白管	自氧化测定管
SOD Assay Buffer	0.94	0.94
蒸馏水	0.8	0.8
空白对照液	0.06	-
邻苯三酚显色液	-	0.06

加入显色液后立即混匀倾入 1cm 比色皿内，在 325nm 波长下测定 0s、30s、60s、90s、120s、150s、180s 两个管的吸光值，计算线性范围内每分钟吸光度的增值(自氧化测定管-自氧化空白管)，即邻苯三酚的自氧化速率$\Delta A_{325}(min^{-1})$，该试剂盒经测定$\Delta A_{325}(min^{-1})$约为 0.060，可通过调节邻苯三酚的加入量控制自氧化速率在每分钟 0.060~0.07。

3、 样品 SOD 抑制邻苯三酚自氧化速率测定：按照下表依次加入相应成分，加入显色液后

立即混匀倾入 1cm 比色皿内，在 325nm 波长下测定两个管的吸光值，使抑制邻苯三酚自氧化的速率约为 1/2 邻苯三酚的自氧化速率，即$\Delta A'_{325}(min^{-1})$为 0.030。

加入物(ml)	样品空白管	样品测定管
SOD Assay Buffer	0.94	0.94
蒸馏水	0.72	0.72
样品提取液	0.08	0.08
空白对照液	0.06	-
邻苯三酚显色液	-	0.06

计算:

SOD 活力单位定义：25℃时，在 1ml 反应液中每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%时的酶量定义为 1 个活性单位(U)，即在 325nm 处为 0.03OD/min 为一个活力单位。若自氧化速率为 35%~65%，通常可按比例计算，不在此范围内的数值应增减样液用量。

抑制率

$=[\Delta A_{325}(min^{-1}) - \Delta A'_{325}(min^{-1})]/\Delta A_{325}(min^{-1}) \times 100\%$

液体样品中总 SOD 活力(U/ml)

=抑制率/50%×1.8×(1/V) ×D

组织、细胞、植物等固体样品匀浆液中总 SOD 活力(U/g)

$=$抑制率/50%×1.8×(1/V) ×D×(V_T/m)

血液中总 SOD 活力(U/ml)

$=$抑制率/50%×1.8×(1/V) ×D×(V_T/ V_0)

血液中总 SOD 活力(U/g·Hb)

=血液中总 SOD 活力(U/ml)/Hb(g·Hb /ml)×1000

式中：$\Delta A_{325}(min^{-1})$=邻苯三酚自氧化速率

$\Delta A'_{325}(min^{-1})$=样品管抑制邻苯三酚自氧化速率

1.8=反应液总体积(ml)

V=测定时样品所用体积(ml)

D=提取液稀释倍数

V_T=SOD 提取液总体积(ml)

m=样品质量(g)

V_0=采血量(ml)

Hb=血红蛋白含量(g·Hb/ml)

注意事项:

1、 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、 细胞或组织等样品制备时不易采用含有 Triton X-100 等去垢剂的溶液。
3、 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 以及维生素 C 都会使测定出来的吸光度显著升高，应设法除去或不添加相关成分。
4、 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样品。
5、 在邻苯三酚自氧化速率与酶活力测定过程中，记录时间应准确一致，以保证吸光度读数的准确性。
6、 反应温度、pH 和邻苯三酚的浓度都对结果有影响，故应严格控制。
7、 所有实验器材必须清洁干燥。
8、 SOD 对邻苯三酚自氧化速率的抑制率在 5min 内呈线性。
9、 邻苯三酚自氧化速率以 0.06 为标准，可控制在 0.06~0.07 之间，可通过适当增减邻苯三酚的用量加以调节。
10、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
11、 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)

