总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(黄嘌呤氧化酶微板法)

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(黄嘌呤氧化酶微板法)采用经典的氮蓝四唑(NBT)显色法,其检测原理是通过黄嘌呤(Xanthine)及黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase)反应系统产生超氧阴离子(O^{2-}.),将氮蓝四唑还原为蓝色的甲臜(formazan),后者在 560nm 处有强吸收。而 SOD 可清除超氧阴离子,从而抑制了甲臜的形成。反应液蓝色越深,说明 SOD 活性愈低,反之则酶活性越高。据此通过酶标仪或分光光度计进行比色分析就可以计算出超氧化物歧化酶的活性水平。本产品可用来检测细胞或组织匀浆液上清、全血、红细胞抽提物、 血清等样品中的 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	GCTE0727 100T	Storage
试剂(A): 提取液	250ml	RT
试剂(B): SOD buffer	25ml	RT
试剂(C): Xant 溶液	3ml	4℃ 避光
试剂(D): NBT 溶液	3ml	4℃ 避光
试剂(E): 酶溶液	0.35ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

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、小试管、酶标仪、酶标板、水浴锅、金属浴或恒温箱

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①血浆或含红细胞的样品:抗凝管收集血液,颠倒混匀,4℃ 1000r/min 离心 10 分钟,移取上清至另一新的 1ml 离心管中,用生理盐水适当稀释后即可作为血浆样本进行检测,

如超过检测范围，用生理盐水稀释后再测。如果需要测定红细胞中 SOD 活性，则应取上述细胞沉淀，用生理盐水洗涤 1~2 次，再按照每 10^6 细胞加入 500～1000μl 生理盐水的比例，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。

②组织样品：动物用含 20U/ml 肝素钠的生理盐水(0.9%)灌流清除血液后获取组织样品，按照每 100mg 组织加入 900~1900μl 提取液的比例，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。

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 5×10^6 细胞加入 1000μl 生理盐水的比例，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)0.1~0.2g，剪碎，置于 4℃预冷的研钵或匀浆器中，加入预冷提取液 1ml，4℃或冰浴研磨至匀浆后转移至离心管，用 1ml 提取液冲洗研钵或匀浆器并转入离心管，4℃ 10000r/min 离心 10min，取上清液(SOD 粗提液)用于酶活性的测定。

⑤澄清液体样品可取原液直接测定，浑浊液体样品可经 4℃ 8000r/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-70℃冻存，但建议尽量当天完成测定。、

2、配制 NBT 工作液：按 SOD buffer：Xant 溶液：NBT 溶液=20：2：2 的比例混合即成，根据待检测样品(包括标准品)的数量，配置适量的 NBT 工作液，4℃保存，现配现用。

3、配制酶工作液：将酶溶液：蒸馏水=1:9 稀释使用，用多少配多少。第一次使用，应将酶工作液放入离心机离心后再开盖使用。

4、SOD 加样：参考下表使用小离心管设置空白管、测定管。并按顺序依次加入各种溶液，进行相应操作。

加入物(μl)	空白管	测定管
待测样品(上清液)	—	18
NBT 工作液	240	240
蒸馏水	60	42
酶工作液	30	30
充分混匀，30℃水浴 30min		

5、SOD 测定：酶标仪开机提前预热 30min，在 560nm 处测各管 OD 值。

计算：

1、抑制百分率的计算：

抑制百分率=($A_{空白}$-$A_{测定}$)/$A_{空白}$×100%

抑制百分率一般在 10~90%范围内，如果小于 10%或者大于 90%，则通常需要调整加样量并重新测定。如果测定出来的抑制百分率偏高，则需将样本用提取液适当稀释；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本或者提高操作表中样本体积，同时减少蒸馏水体积。

2、SOD 活力单位定义：在上述黄嘌呤氧化酶偶联反应体系中，抑制百分率为 50%时，反应体系中 SOD 酶活性定义为一个酶活性单位(U)。

3、SOD 酶活性计算：

按液体样本体积算：

SOD 活性(U/mL)=[抑制百分率/(1-抑制百分率)×$V_{总反}$]/$V_{样}$

按样品鲜重算：

SOD 活性(U/g 鲜重)=[抑制百分率/(1-抑制百分率)×$V_{总反}$]/(W×$V_{样}$÷$V_{样总}$)

按样品蛋白浓度算：

SOD 活性(U/mg prot)=[抑制百分率/(1-抑制百分率)×$V_{总反}$]/(C_{pr}×$V_{样}$)

按细胞/细菌数量算：

SOD 活性(U/N 个)=[抑制百分率/(1-抑制百分率)×$V_{总反}$]/(N×$V_{样}$÷$V_{样总}$)

注：$A_{空白}$：空白管吸光度值

$A_{测定}$：样品测定管吸光度值

$V_{总反}$：反应总体积，mL

W：样品鲜量，g

$V_{样}$：反应体系中待测样品加入量，mL

$V_{样总}$：样品提取液总体积，mL

C_{pr}：样品提取液蛋白质浓度，mg/mL

N：细胞或细菌总数

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、 反应温度、pH 和酶溶液的浓度都对结果有影响，故应严格控制。
6、 所有实验器材必须清洁干燥。
7、 配制的 NBT 工作液如出现淡黄色沉淀或絮状物应弃用，否则效果不佳。
8、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
9、 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)
GCTE0721	总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(NBT 核黄素比色法)