

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(H₂O₂)和氧气(O₂),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

名称 \ 编号	ADS080TE0	ADS080TE1	Storage
	50T	100T	
试剂(A): SOD Assay Buffer	50ml	100ml	RT
试剂(B): 邻苯三酚显色液	5ml	10ml	4°C 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、小试管
- 3、分光光度计、石英比色杯
- 4、水浴锅或恒温箱

操作步骤(仅供参考)

1、准备样品:

①血浆或含红细胞的样品:如果测定血浆中SOD活性,则从待测样品中分离出血清或血浆,不应有溶血,如果含有红细胞应先4°C 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500 μ l磷酸缓冲液(pH7.8)的比例，用玻璃匀浆器在4 $^{\circ}$ C或冰浴匀浆，4 $^{\circ}$ C 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10⁶细胞加入300~500 μ l磷酸缓冲液(pH7.8)的比例，用玻璃匀浆器在4 $^{\circ}$ C或冰浴匀浆，4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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(50mMpH7.8)，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10~20 μ g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20~100 μ g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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $\Delta A_{325}(\text{min}^{-1})$ ，该试剂盒经测定 $\Delta A_{325}(\text{min}^{-1})$ 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 $\Delta A'_{325}(\text{min}^{-1})$ 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°C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。

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

液体样品中总SOD活力(U/ml)

$$= \text{抑制率} / 50\% \times 1.8 \times (1/V) \times D$$

组织、细胞、植物等固体样品匀浆液中总SOD活力(U/g)

$$= \text{抑制率} / 50\% \times 1.8 \times (1/V) \times D \times (V_T/m)$$

血液中总SOD活力(U/ml)

$$= \text{抑制率} / 50\% \times 1.8 \times (1/V) \times D \times (V_T/V_0)$$

血液中总SOD活力(U/g·Hb)

$$= \text{血液中总SOD活力(U/ml)} / \text{Hb(g·Hb/ml)} \times 1000$$

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

$\Delta A'_{325}(\text{min}^{-1})$ = 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，以防影响后续实验结果。

有效期：6个月。低温运输，按要求保存。