

## 总超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (NBT核黄素比色法)

产品货号: BA1766

产品规格: 50T/100T

### 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(NBT核黄素微板法)(Total Superoxide Dis mutase Assay Kit with NBT)是一种基于NBT的显色反应,通过比色来检测组织、细胞、植物、血清或其它样品中SOD即超氧化物歧化酶活性的试剂盒,其检测原理是利用SOD抑制NBT在光照下的还原作用来确定酶活性大小。在有氧化合物存在的情况下,核黄素被光还原,后经一系列的反应可将NBT还原为蓝色的甲贍(formazan),后者在560nm处有强吸收,SOD可清除超氧阴离子( $O_2^-$ ),从而抑制了甲贍的形成,反应液蓝色愈深说明超氧化物歧化酶活性愈低,反之则酶活性愈高,据此通过比色分析就可以计算出超氧化物歧化酶活性水平。本试剂盒仅用于科研领域,不宜用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

试剂名称	50T	100T	保存条件
试剂(A): SOD 提取液	250ml	2×250ml	室温
试剂(B): NBT 显色液	15ml	30mg	-20℃, 避光
试剂(C): 酶溶液	15ml	30ml	-20℃, 避光
试剂(D): 反应启动液	10ml	20ml	4℃

### 自备材料:

1. 生理盐水或 PBS
2. 离心机、离心管、小试管
3. 分光光度计、比色杯
4. 水浴锅或恒温箱

### 操作步骤:

#### 1. 准备样品:

①血浆或含红细胞的样品:从待测样品中分离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 提取液稀释后检测。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 500 $\mu$ l 全血,4℃3000g 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 100 mg 组织加入 500 $\mu$ l SOD 提取液的比例,用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆,4℃ 4000g 离心 10min,取上清液(SOD 粗提液)用于酶活性的测定。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 300-500 $\mu$ l SOD 提取液的比例, 用玻璃匀浆器在 4 $^{\circ}$ C 或冰浴匀浆, 4 $^{\circ}$ C 10000g 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, 加入预冷提取液 1ml, 低温研磨至匀浆后转移至离心管, 用 3ml 提取液冲洗研钵或匀浆器并转入离心管, 加提取液至总体积为 4ml, 4 $^{\circ}$ C 10000r/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, 应相应减少提取液的总体积, 以便提高 SOD 酶的浓度。

⑤上述样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度, 通常 10-20 $\mu$ g 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 $\mu$ 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, 用本试剂盒提供的 SOD 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. 配制 NBT 酶工作液: 按照每个反应 1.6ml 的体积, 均匀混合 1ml SOD 提取液、0.3ml NBT 显色液、0.3ml 酶溶液, 即可配置成 1.6ml NBT 酶工作液, 根据待检测样品(包括标准品)的数量, 配置适量的 NBT 酶工作液。具体配置方法可以参考下表。配制好的 NBT 酶工作液 4 $^{\circ}$ C 或冰浴保存, 可以在当天使用, 但建议尽量现配现用。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。

加入物(ml)	1 次	10 次	20 次
SOD 提取液	1.0	10	20
NBT 显色液	0.3	3	6
酶溶液	0.3	3	6
NBT 酶工作液	1.6	16	32

3. (选做)准备 SOD 标准品: 需自备 SOD 标准品, 用本试剂盒提供的 SOD 提取液将 SOD 标准品稀释至如下系列浓度: 200、100、50、20、10、5、2U/ml, 各取 20 $\mu$ l 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。
4. SOD 加样: 参考下表使用小离心管或试管设置空白对照管、光照对照管、测定管。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。

加入物(ml)	空白对照管	光照对照管	测定管
SOD 提取液	0.2	0.2	-
待测样品(上清液)	-	-	0.2
NBT 酶工作液	1.6	1.6	1.6
反应启动液	0.2	0.2	0.2

5. SOD 测定: 混匀, 取空白对照管置于暗处, 其他各管置于 4000Lx 日光下反应 20min, 各管受光情况应一致, 温度高时时间缩短, 低时延长。反应结束后, 以不照光的空白对照管调零, 用分光光度计或酶标仪测定 560nm 处吸光度, 如果用分光光度计, 比色杯光径 1cm, 加入的上清量因根据比色杯的最小量程而定。

### 计算:

SOD 活力单位定义: 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) =  $(A_{\text{光照}} - A_{\text{测定}}) / (50\% \times A_{\text{光照}} \times V_T)$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

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

式中： $A_{\text{光照}}$  =光照对照管的吸光度

$A_{\text{测定}}$  =测定管的吸光度

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)

**有效期：**12个月有效。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>