



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(邻苯三酚比色法)

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。

源叶生物 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。

组成:

编号	R21883	R21883	Storage
名称	50T	100T	
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	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
- 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 SDO 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℃ 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 10⁶ 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 10~20 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℃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 $\Delta A_{325}(\text{min}^{-1})$, 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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

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

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)



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

有效期: 6 个月有效。