

超氧化物歧化酶 (SOD) -NBT 法试剂盒说明书

(货号: BN72168 微板法 96 样)

一、产品简介:

超氧化物歧化酶 (SOD) (EC 1.15.1.1) 在动植物、微生物和培养细胞体内广泛存在, 其具有抗衰老、提高机体对多种疾病的抵抗力, 能增强机体对外界环境的适应力。

本试剂盒是 NBT 法测定 SOD 活性, NBT 可以和黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO)催化产生的超氧化物阴离子(O_2^-)反应产生有颜色物质, 后者在 560nm 处有吸收; SOD 可清除 O_2^- , 从而抑制有色物质形成; 反应液颜色越深, 说明 SOD 活性愈低, 反之活性越高。

二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体×2 支 EP 管	4℃ 保存	临用前先离心, 使液体落入底部, 再开盖, 每支加 1.1ml 水混匀备用, -20℃ 保存。
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂×4 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 每支加 0.1mL 去离子水振荡或超声溶解后

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

① 组织样本:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.25g), 加入 1mL 提取液, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清作为待测液。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 560nm。
- ② 测定前将试剂一、三和四 25℃ 水浴 5min 以上。
- ③ 用排枪操作, 以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。
- ④ 试剂四每次加样前**务必**混匀, 保证试剂的均一性。
- ⑤ 按照以下加样表, 在 96 孔板中依次加入试剂:

试剂名称 (μ L)	样本管	样本对照管* (可选做)	空白管 1 (仅做一次)	空白管 2 (仅做一次)
试剂一	60	60	60	60

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

试剂二	20		20	
蒸馏水		20	20	40
样本	20	20		
试剂三	20	20	20	20
试剂四	80	80	80	80
充分混匀，室温静置 30min 后，560nm 处测定各管吸光值 A。				

五、结果计算：

1、抑制百分率的计算：

$$\text{抑制百分率} = \frac{(A_{\text{空白管1}} - A_{\text{空白管2}}) - (A_{\text{样本管}} - A_{\text{样本对照管*}})}{(A_{\text{空白管1}} - A_{\text{空白管2}})} \times 100\%$$

控制样本的抑制百分率在 30-80% 范围内。1：若抑制百分率小于 30%，则需重新准备浓度比较高的待测样本；2：若大于 80%，则需将样本粗提液用蒸馏水或提取液适当稀释。

2、SOD 酶活性计算：

SOD 酶活性单位：在上述黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分率为 50% 时，反应体系中的 SOD 酶活力定义为一个酶活力单位(U/mL)。

a. 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/g 鲜重)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D \end{aligned}$$

b. 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/mg prot)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

c. 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活力(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.02 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$

d. 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性(U/mL)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div V_1 \times D \\ &= 10 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times D \end{aligned}$$