

超氧化物歧化酶（SOD）分型测定试剂盒说明书(精简版)

（货号：A001-2 抽提法测 T-SOD、CuZn-SOD、Mn-SOD 比色法）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

【试剂盒介绍】

本试剂盒采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase SOD)活力，可测血清(浆)、脑脊液、胸水、腹水、肾透析液、尿液、红细胞、白细胞、血小板、心肌培养细胞、肿瘤培养细胞、各种动植物组织细胞及亚细胞水平(线粒体、微粒体)中的 SOD 活力，并可检测微生物、药物、食品、饮料、化妆品中的 SOD 活力。

【测定意义】

超氧化物歧化酶（SOD）对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用，此酶能清除超氧阴离子自由基（ O_2^- ）保护细胞免受损伤。

【测定原理】

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基（ O_2^- ），后者氧化羟胺形成亚硝酸盐，在显色剂的作用下呈现紫红色，用可见分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时，则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用，使形成的亚硝酸盐减少，比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值，通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。

高等动物细胞内只有二种 SOD 即铜锌-SOD（CuZn-SOD）与锰-SOD（Mn-SOD），二者相加等于总 SOD（T-SOD），经样本前处理过的样本中 Mn-SOD 活力丧失，但 CuZn-SOD 活力不变。

【有效期和保存条件】

本试剂盒保存期：6 个月；贮存温度：4℃，注意 4 号贮备液须放在 -20℃ 以下，温度偏高酶容易失效，所用塑料吸嘴尖要干净，最好消毒，或者用双蒸水将新吸嘴尖头反复冲洗，一定要避免菌类及重金属离子污染。

【所需仪器和自备的试剂】

含 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿（或酶标仪及 96 孔板）、37℃ 恒温水浴或气浴箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、冰醋酸（分析纯，乙酸浓度≥99.5%）、涡旋混匀器、一次性塑料试管（或离心管）、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）、电炉（配试剂加热用）。

【试剂组成与配制】

1、（50 管/24 样，货号 A001-2-1）试剂的组成与配制：（如您只需做 CuZn-SOD 则能做到 48 样）

试剂一：贮备液：5mL×1 瓶（天冷时或放冰箱会有部分结晶析出，需 37℃ 加热溶解后再用）；试剂一应用液配制：用前按 1:9 的比例加双蒸水稀释，4℃ 保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：贮备液：350μL×1 支，-20℃ 以下保存(如需多次使用，请在第二次解冻后分装保存)；稀释液：5mL×1 瓶，4℃ 保存。试剂四应用液的配制：用时按贮备液:稀释液=1:14 比例配制，用多少配多少，现用现配。

试剂五：粉剂×1 支，用时加入双蒸水 37.5mL(可在液面位置标记一下)加热至 70℃~80℃ 溶解后备用，若加热过程中水分蒸发减少，此时必须用双蒸水补充至标记处，配好后的试剂避光 4℃ 保存。

试剂六：粉剂×1 支，用时加入双蒸水 37.5mL 溶解后备用，配好后试剂避光 4℃ 保存。

显色剂的配制：按试剂五:试剂六:冰醋酸=3:3:2 的体积比配显色剂，配好的显色剂 4℃ 避光可保存 3 个月。

试剂七：20mL×1 瓶；4℃ 保存。

2、（100 管/48 样，货号 A001-2-2）试剂的组成与配制：（如您只需做 CuZn-SOD 则能做到 96 样）

试剂一：贮备液，10mL×1 瓶（天冷时或放冰箱会有部分结晶析出，需 37℃ 加热溶解后再用）；试剂一应用液的配制：用前按 1:9 的比例加双蒸水稀释，4℃ 保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：贮备液 350μL×2 支，-20℃ 以下保存(如需多次使用，请在第二次解冻后分装保存)；稀释液 10mL×1 瓶，4℃ 保存。试剂四应用液的配制：用时按贮备液:稀释液=1:14 比例配制，用多少配多少，现用现配。

试剂五：粉剂×1 支，用时加入双蒸水 75mL(可在液面位置标记一下)加热至 70℃~80℃ 溶解后备用，若加热过程中水分蒸发减少，此时必须用双蒸水补充至标记处，配好后的试剂避光 4℃ 保存。

试剂六：粉剂×1 支，用时加双蒸水 75mL 溶解后备用，配好后试剂避光 4℃ 保存。

显色剂的配制：按试剂五:试剂六:冰醋酸=3:3:2 的体积比配显色剂，配好的显色剂 4℃ 避光可保存 3 个月。

试剂七：30mL×1 瓶；4℃ 保存。

【样本前处理】

1、**血清（浆）等液体样本：**取部分做预试(参考《注意事项》)，摸索最佳浓度后，以最佳浓度进行第 2 步处理；

组织样本：准确称重，按重量（g）:体积（mL）=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质（推荐 0.9% 的生理盐水或 0.1mol/L 且 pH 值为 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液），冰水浴条件机械匀浆，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液（10% 匀浆上清）摸索最佳浓度后，以最佳浓度进行第 2 步处理。

细胞样本：将收集好的细胞，用 PBS 清洗 1~2 次后，低速离心收集沉淀细胞，再加入 0.3~0.5mL 0.1M PH 7.4 的等渗 PBS 缓冲液悬浮细胞，超声或手动研磨破碎细胞，破碎后若无明显固体物存在，可直接使用（取部分做预试摸索最佳取样浓度后用），若有明显固体物存在，则需低速（2000 转/分）离心 5-10 分钟后取上清做预试后，再进行第 2 步处理。（每份细胞数推荐 10⁶ 以上）

（注：组织或细胞匀浆液需同步测定蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本所有售）

2、取上述样本 0.2mL 加试剂七 0.2mL，旋涡混匀器充分混匀 1 分钟后，以 3500~4000 转/分，离心 15 分钟（台式离心机），取上清进行 CuZn-SOD 测定(此上清液即经过处理后的样本，Mn-SOD 活力丧失而 CuZn-SOD 活力不受影响)；同时取生理盐水 0.2mL 加试剂七 0.2mL，旋涡混匀器充分混匀 1 分钟后，以 3500~4000 转/分，离心 15 分钟（台式离心机），取上清作 CuZn-SOD 对照。

注：如样本量不够可按比例减少样本和试剂用量。

【操作表】

试 剂	T-SOD 对照管	T-SOD 测定管	CuZn-SOD 对照管	CuZn-SOD 测定管
试剂一应用液(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
双蒸水(mL)	a*			
样本(mL)		a*		
对照上清(mL)			a*	
样本上清(mL)				a*
试剂二(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
试剂三(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
试剂四应用液(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
用旋涡混匀器充分混匀，置 37℃ 恒温水浴或气浴 40 分钟				
显色剂(mL)	2	2	2	2
混匀，室温放置 10 分钟，波长 550nm，光径 1cm，双蒸水调零，分光光度计测定各管吸光度值（或取 0.2mL 反应液加入到 96 孔板				

中, 550nm 处酶标仪读数) (96 孔板事先读下孔板值, 计算时各孔扣除各自的空板值)

【活力定义及计算】

(一)、血清(浆)、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等总 SOD 与 CuZn-SOD 活力计算:

1、定义: 每毫升样本使反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

2、计算公式:

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

$V_{\text{反总}}$: 反应液总体积, (a+3.3)mL;

$V_{\text{样}}$: 取样量, (a)mL;

N : 样本测试前稀释倍数。

(二)、组织中 SOD 活力计算:

1、定义: 每毫克组织蛋白在 1mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

2、计算公式:

$$\text{SOD 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应液总体积, (a+3.3)mL;

$V_{\text{样}}$: 取样量, (a)mL;

Cpr : 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

注意事项

注 1: a^* 代表样本取样量和双蒸水取样量。

注 2: 最佳取样量因样品种类不同, 其 SOD 活力不一。根据酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系, 各种测定样品取样量不一样, 在每测定一种新的样品前最好选择一个最佳取样量。

注 3: 按照操作表顺序加试剂, 不可配制混合试剂 (样本可以在加试剂一之前加)。

最佳取样量的确定: 如果您第一次使用本试剂盒测试某一种新的样品时最好先做三只不同取样量的测试管。分别取 10 μ L、30 μ L、50 μ L、做三只样本管及一只对照管按 T-SOD 操作表进行预试验, 以确定最佳取样量。

最佳取样量的计算: 抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{对照}}$

最佳取样范围: 抑制率应该在 0.15~0.55 之间 (此段曲线基本呈正比曲线关系)。

最佳取样量的选择: 取百分抑制率在 45%~50% 左右的这一管的取样量作为最佳取样量。

最佳取样量的调整: 若百分抑制率大于 60% 时 (曲线为平坦部分), 则需将样品浓度稀释或减少取样量后再测试。若百分抑制率小于 20% 时, 则需将样品量加大后测试。

这样做对科研结果分析及 t 检验有很大帮助; 若百分抑制率大于 60% 或小于 10%, 各个测定组的结果在 t 检验运行中常常无显著性差异。

注 4: 最佳取样量参考值:

① 红细胞抽提液一般为 8.0~10 μ L;

② 大鼠红细胞抽提液为 5 μ L 左右;

③ 人血浆 (血清) 一般为 30~50 μ L;

④ 小鼠血浆 (血清) 20 μ L 左右;

⑤ 1% 组织匀浆 30~50 μ L;

⑥ 胞浆 20~50 μ L;

⑦ 心肌灌流液或肾透析液 100~200 μ L;

⑧ 白细胞悬液 100~200 μ L;

⑨ 细胞培养液 100~200 μ L。

注 5: 组织样本匀浆液需要同时测定蛋白浓度, 该试剂本所有售 (货号 A045-2 或者 A045-3/-4)。