

总超氧化物歧化酶（T-SOD）测定试剂盒 说明书

（货号：A001-1 羟胺法）

南京建成生物工程研究所

地 址：	南京市中央路 258-27 号 新立基大厦 1106 室	电 话：	(025) 83360321、 (025) 83360969
		传 真：	(025) 83227943、 (025) 83609960
联系人：	季建平	建成主页：	www.njjcbio.com
技术支持：	(025) 83360272、	财务电话：	(025) 83112287
	(025) 83360217、 19951670086（手机）		
企业 QQ：	800033596	E-mail：	njjcbio@vip.163.com

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)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,用可见光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),

低等动物、单细胞生物、及植物中除了铜锌-SOD (CuZn-SOD) 与锰-SOD(Mn-SOD), 还有铁-SOD (Fe-SOD)。通过测定 T-SOD、Mn-SOD、CuZn-SOD、Fe-SOD, 可以计算出各分型 SOD 的活力。

●试剂盒有效期和保存条件

本试剂盒保存期: 6 个月; 贮存温度: 4℃, 注意试剂四贮备液需-20℃以下冻存 (温度越低保存时间越长, 同时要避免反复冻融), 否则容易失效, 所用吸嘴要干净, 最好消毒, 或者用蒸馏水将新吸嘴尖头反复冲洗, 烘干后用, 一定要避免菌类及重金属离子污染。

●实验中所需的仪器和自备的试剂

1. 可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿或酶标仪(550±10nm)及 96 孔板
2. 37℃恒温水浴锅或气浴箱
3. 蒸馏水、生理盐水
4. 高脂血症血清或红细胞样本会用到无水乙醇及三氯甲烷 (均为分析纯)

● 试剂盒组成与试剂配制

	组 分	50 管/48 样 (货号 A001-1-1)	100 管/96 样 (货号 A001-1-2)	保存条件
试剂一	底物贮备液	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
	试剂一应用液的配制：用时按 1:9 的体积比加蒸馏水稀释，4℃ 保存。 (注：试剂一贮备液天冷时或 4℃ 保存一段时间后可能会有结晶析出， 需 37℃ 水浴加热溶解后再用)			
试剂二	液体	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
试剂三	液体	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
试剂四	贮备液	350μL×1 支	350μL×2 支	-20℃ 以下
	稀释液	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
	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，现配现用。(试剂四贮备液要避免反复冻融)			
试剂五	显色 A 液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	4℃ 避光
试剂六	显色 B 液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	4℃ 避光
显色剂的配制：按试剂五(显色 A 液)：试剂六(显色 B 液)：蒸馏水=3:3:4 的体积比配制，用多少配多少，现用现配。				

●测定步骤

一、样本前处理:

血清（浆）、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等液体样本：直接检测（先确定最佳取样浓度后再进行正式实验）；（高脂血症血清处理方法见附录 II）

动物组织样本：准确称取动物组织重量，按重量(g)：体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质(推荐生理盐水或 0.01mol/L 的 PBS)，冰水浴条件下，机械匀浆,制备成 10%的匀浆液, 3500 转/分钟,离心 10 分钟，取上清液先进行最佳取样浓度摸索，确定最佳取样浓度后再按操作表进行正式实验；（该匀浆上清需测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）

植物组织样本：准确称取植物组织重量，按重量(g)：体积(mL)=1: 4 的比例，加入 4 倍体积的匀浆介质(推荐 0.01mol/L PH7.0~7.4 的 PBS)，冰水浴条件下，机械匀浆，制备成 20%的匀浆液，3500~4000 转/分钟，离心 10 分钟，取上清液进行预试摸索最佳取样浓度后按操作表进行正式实验（有些药材或植物粉末可用同样的方法进行处理）；

细胞样本：收集细胞后，每份细胞（细胞数量尽量不要低于 10^6 个，越多越好）加入 0.2-0.3mL 的生理盐水（或者 0.01mol/L 的 PBS），冰水浴下超声破碎（功率 100-300W，运行 5 秒，间隔 15 秒，反复 3-5min），4000 转/分离心

10 分钟，取上清液待测（先进行预试以确定最佳样本浓度，再批量进行正式实验；上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

红细胞样本：处理及操作方法见附录 III；

二、操作表：

试 剂	测 定 管	对 照 管
待测样品(mL)	0.05	
蒸馏水(mL)		0.05
试剂一应用液(mL)	1.0	1.0
试剂二(mL)	0.1	0.1
试剂三(mL)	0.1	0.1
试剂四应用液(mL)	0.1	0.1
旋涡混匀，置 37℃恒温水浴或气浴箱反应 40 分钟		
显色剂(mL)	2	2
涡旋混匀，室温(25℃)避光静置 10 分钟，波长 550nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，分光光度计测定各管 OD 值(A)（或每管取 200μL 到 96 孔板中，酶标仪 550nm 处读数（同时设一孔加 200μL 蒸馏水一起读数，读完各孔 OD 值均减去蒸馏水孔 OD 值））。		

注 1: 最佳取样浓度因样品种类不同, 其 SOD 活力不同。根据酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系 (附录: SOD 标准曲线), 各种测定样品取样浓度不一样, 在每测定一种新的样品前最好进行预试选择一个最佳取样浓度。

注 2: 按照操作表顺序加试剂, 试剂二和试剂三可以预先按操作表比例混合好, 一次性加入反应。但不可将试剂一、二、三混合或一、二、三、四混合, 会影响结果。

样本最佳取样浓度的摸索

样本稀释: 如果您第一次使用本试剂盒测试某一种新的样品时最好挑选 2 例相对差异较大的样本, 每样做三种不同稀释倍数的测试管, 分别以我们举例的取样浓度为中间浓度, 往上浓缩一倍和往下稀释一倍 (如果举例中没有您的样本参考信息, 您可以自行稀释, 如 5 倍、10 倍、20 倍稀释等), 2 个样本一共做 6 个稀释倍数管, 外加一个对照管按操作表进行预试验, 以确定最佳取样浓度。

最佳取样浓度的选择: 取抑制率在 40%~50%之间的这一管的样本浓度作为最佳取样浓度。

抑制率范围: 大批量实验时, 有效抑制率在 15~55%内均可。

最佳取样浓度的调整: 若百分抑制率大于 60%时, 则需将样品稀释后再测试。

若百分抑制率小于 15%时，则需将样品量加大或用更高浓度再测。这样做对科研结果分析及检验有很大帮助；若百分抑制率大于 60%或小于 10%，各个测定组的结果在检验运行中易出现无显著性差异情况。

注 4：最佳取样浓度参考值：

- ①红细胞抽提液一般要再稀释 5 倍；
- ②大鼠红细胞抽提液要稀释 10 倍左右；
- ③人血浆（血清）一般为 2 倍稀释或不稀释；
- ④小鼠血浆（血清）2.5 倍左右稀释；
- ⑤1%组织匀浆 2 倍稀释或不稀释；
- ⑥胞浆 2 倍稀释或不稀释；
- ⑦心肌灌流液或肾透析液取原液且增加取样量到 100~200 μ L；
- ⑧白细胞悬液取原液且增加取样量到 100~200 μ L；
- ⑨细胞培养液取原液且增加取样量到 100~200 μ L。

三、计算：

1、样本抑制率计算公式：

$$\text{样本SOD抑制率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

2、血清（浆）、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等液体样本的计算：

定义：每毫升样本使 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）。

$$\text{计算公式：} \quad \frac{\text{SOD活力}}{(\text{U/mL})} = \frac{\text{样本SOD}}{\text{抑制率}(\%)} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

3、动、植物组织（或细胞）SOD 活力按蛋白计算：

定义：每毫克组织蛋白使 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）。

$$\text{计算公式：} \quad \frac{\text{SOD活力}}{(\text{U/mg蛋白})} = \frac{\text{样本SOD}}{\text{抑制率}(\%)} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \text{Cpr}$$

4、植物组织 SOD 活力按样本鲜重计算：

定义：每克组织使 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）。

$$\text{计算公式：} \quad \frac{\text{SOD活力}}{(\text{U/g组织})} = \frac{\text{样本SOD}}{\text{抑制率}(\%)} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

以上 4 种公式中，

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，3.35mL；

$V_{\text{样}}$ ：样本加入量，0.05mL；

N：样本测试前稀释倍数；

Cpr：匀浆液蛋白浓度，mg/mL；

W：组织重量，g；

$V_{\text{样总}}$ ：样本匀浆时加入的提取液的总体积，mL。

部分样本参考值

○ 小鼠 (Mouse)

- 血清 (浆) T-SOD 活力: 110.446 ± 21.325 U/mL (2.5 倍稀释)
- 肝组织 T-SOD 活力: 269.274 ± 23.448 U/mgprot (稀释到 0.25% 组织匀浆浓度)
- 脑组织 T-SOD 活力: 108.790 ± 13.494 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)
- 肾组织 T-SOD 活力: 154.277 ± 15.646 U/mgprot (稀释到 0.5% 组织匀浆浓度)
- 心肌组织 T-SOD 活力: 174.330 ± 19.961 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)
- 皮肤组织 T-SOD 活力: 69.01 ± 19.95 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)
- 骨骼肌 T-SOD 活力: 101.717 ± 12.190 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)

○ 大鼠 (Rat)

- 血清 (浆) T-SOD 活力: 262.786 ± 23.240 U/mL (10 倍稀释)
- 全血 T-SOD 活力: 21.554 ± 2.116 U/mgHb
- 肝组织 T-SOD 活力: 214.689 ± 38.803 U/mgprot (稀释到 0.25% 组织匀浆浓度)
- 肾组织 T-SOD 活力: 136.825 ± 24.763 U/mgprot (稀释到 0.5% 组织匀浆浓度)
- 肠组织 T-SOD 活力: 74.738 ± 11.351 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)
- 肺组织 T-SOD 活力: 35.542 ± 15.465 U/mgprot (稀释到 2% 组织匀浆浓度)
- 脑组织 T-SOD 活力: 140.177 ± 26.878 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)

- 脑皮质组织 T-SOD 活力: 79.037 ± 3.996 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)
- 海马组织 T-SOD 活力: 136.863 ± 36.472 U/mgprot (稀释到 1% 组织匀浆浓度)
- 心肌组织 T-SOD 活力: 128.292 ± 9.219 U/mgprot (稀释到 0.5% 组织匀浆浓度)

○ 兔 (Rabbit)

- 血清 T-SOD 活力: 429.04 ± 31.60 U/mL (5 倍稀释)

○ 鸡 (Chicken)

- 血清 T-SOD 活力: 213.208 ± 73.368 U/mL

○ 牛 (Bovine)

- 血清 T-SOD 活力: 123.691 ± 20.008 U/mL
- 胃液 T-SOD 活力: 27.880 ± 8.076 U/mL

○ 人 (Human)

- 血清 T-SOD 活力: 104.2 ± 18.8 U/mL (n=100 人, 2 倍稀释);
- Mn-SOD 活力: 41.21 ± 3.2 U/mL (n=100 人, 2 倍稀释);
- 红细胞 T-SOD 活力: 19246 ± 132 U/gHb (n=40 人, 5 倍稀释);
- 全血 T-SOD 活力: 21.554 ± 2.117 U/mgHb

以上均为 $\bar{X} \pm SD$ 。

建议各实验室建立自己的正常参考值范围。

注 意 点

- 1、在测量时，可使用一次性塑料试管或离心管操作，本公司有售。
- 2、为降低操作时间误差，建议每批操作样本数不大于 20 个，且每批实验管总数要尽量平均。
- 3、对照管每批实验最好做 2 支，并且放在所有测试管的中间做，取其平均值。或每 9 支测定管做一支对照管。
- 4、测试前先预试以确定最佳取样浓度：当您第一次使用本试剂盒测试某一种新的组织样品时最好先做三只不同浓度的测试管。例如想测 10%脑组织匀浆，以我们举例的取样浓度为中间值取上下 2 倍差距的两个浓度三只样本管及一只对照管，按操作表进行预试验，以确定最佳取样浓度，然后计算：样本抑制率应该在 15~55%之间，然后取抑制率在 40%左右的这一管的样本浓度作为最佳取样浓度，因为酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系，若百分抑制率大于 60%时，则需将样品稀释后再测试。若百分抑制率小于 15%时，则需用更大浓度再测。
- 5、EDTA 会螯合重金属酶，导致 SOD 活性降低，甚至测定不出，所以在使用抗凝剂收集血浆时，不能用 EDTA 作为抗凝剂。

本法优点

- 1、**稳定性好**：试剂放在 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 6 个月。取混合血清放在 4°C 的冰箱中，三天内 SOD 活力不变。
- 2、**取样量极微**：本法取手指或耳垂等末梢血 $5\mu\text{L}\sim 10\mu\text{L}$ 稀释后即可测红细胞中的 SOD，只需 1mL 静脉血可测白细胞中的 SOD 及血小板中 SOD，只需 6mg 组织就可测组织匀浆、胞浆、0.2g 组织可测线粒体及微粒体中的 SOD，因此，本法受到科研人员的欢迎。
- 3、**灵敏度高**： $\text{IC}_{50}=0.05\text{g/mL}$ 是邻苯三酚法灵敏度的 18 倍，因而可测定心肌灌流液、脑脊液、胸腹水、肾透析液、心肌培养细胞、肿瘤培养细胞中的 SOD，此法最灵敏。
- 4、**再现性好**：变异系数 $\text{CV}=1.7\%$ ，同一份标本这次测得结果与几天后测得结果相差无几。
- 5、**回收试验**： $\bar{X}\pm\text{SD}=103.3\pm 2.63\%$
- 6、**受外界影响因素小**：本法经数百上千的科研单位及高校使用，一致认为此法为目前国内首创，优于其它各种化学检测法，优于放免法。
- 7、**测试面广**：既可测 T-SOD 又可测 Mn-SOD 也可测 CuZn-SOD，本法测试各种动物红细胞、白细胞、血小板、血清（浆）、心肌组织、肺、肝、肾、脾、耳膜、肾上腺等几十种组织匀浆、线粒体、微粒体、离体心肌灌流液、肾透析液、腹水、

胸水、脑脊液、心肌培养细胞、肿瘤培养细胞等，效果均很佳，并可测植物叶、根、茎，及水产品、化妆品、营养品及酒、饮料中 SOD。

8、价廉：本试剂盒主要原料为美国进口，但价格与国内邻苯三酚测定法相近。

9、不需要昂贵或特殊的仪器，只需恒温孵育箱与可见光分光光度计或酶标仪等简单的仪器即可测出高水平的指标。此方法经江苏省卫生厅组织的同行专家鉴定并获卫生厅科技成果一等奖。此专利为国际发明专利，已由中国、美国、英国等国家专利刊收集。

附录 II：高脂血症血清（浆）中 T-SOD 的测定

1、高脂血症血清（浆）样本的前处理：

轻度高脂血症：外观略有混浊，血清测试前处理只需加等量的生理盐水稀释，然后进行检测；

中度高脂血症：外观混浊较明显，血清测试前处理需加等量的生理盐水，再加血清 1/2 量（体积比）的无水乙醇混匀，然后进行检测；

重度高脂血症：取 50 μ L 高脂血清（浆）加生理盐水 200 μ L 混匀后，加无水乙醇 150 μ L，充分混匀 1 分钟，再加入三氯甲烷 150 μ L，充分混匀 1 分钟，3500 转/分（台式离心机），离心 10 分钟，取上清检测。

上清液先参照（Page7 “样本最佳取样浓度摸索”）进行最佳取样浓度摸索。确定最佳取样浓度后再按下表进行正式实验。

2、操作表：

试 剂	测 定 管	对 照 管
上清(mL)	0.15	
试剂一应用液(mL)	1.0	1.0
试剂二(mL)	0.1	0.1
试剂三(mL)	0.1	0.1
试剂四应用液(mL)	0.1	0.1

用旋涡混匀器充分混匀，置 37℃ 恒温水浴或气浴孵育 40 分钟

显色剂(mL)	2	2
上清(mL)		0.15

混匀，室温放置 10 分钟，波长 550nm，1cm 光径，蒸馏水调零，分光光度计比色（或每管取 200 μ L（同时设一孔加 200 μ L 蒸馏水用于调零）酶标仪 550nm 处读数）。

3、高脂血症血清（浆）SOD 活力的计算：

定义：每毫升样本使 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）。

计算公式:
$$\text{样本SOD抑制率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$$\text{SOD活力 (U/mL)} = \frac{\text{样本SOD抑制率 (\%)}}{50\%} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 3.45mL;

$V_{\text{样}}$: 样本加入量, 0.15mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

[注]: 重度高脂血症血清(浆)
$$\text{测试前的稀释倍数} = \frac{\text{取样量}50\mu\text{l} + \text{生理盐水}200\mu\text{l} + \text{无水乙醇 } 150\mu\text{l}}{\text{取样量}50\mu\text{l}} = \frac{400\mu\text{l}}{50\mu\text{l}}$$

附录III:红细胞中 T-SOD 的测定

1、样本前处理（红细胞抽提液的制作）：

- ①、采集新鲜血、或肝素抗凝的静脉血或动脉血 50 μ L，加入盛有 1~2mL 的生理盐水的带刻度离心管中，500~1000 转/分，离心 10 分钟。
- ②、用微量移液器也可用针筒接上麻醉针头吸去上清液（要吸干净），留沉淀的红细胞。
- ③、在沉淀的红细胞中加入冷蒸馏水 0.2mL，混匀（使红细胞充分溶解：**将溶血液对光观看呈透明状则已充分溶解**）。
- ④、加入 95%乙醇 0.1mL，振荡 30 秒。
- ⑤、加入三氯甲烷（氯仿）0.1mL 置旋涡混匀器充分抽提混匀一分钟。
- ⑥、3500 转/分离心 8 分钟。此时液体分三层：上层为 SOD 抽提液，中层为血红蛋白沉淀物，下层为三氯甲烷。若上清有混浊可加入少量固体 NaCl 后再离心 5 分钟，即可澄清。记录上清液体积，取 5~20 μ L 参照 **Page13 “样本最佳取样浓度摸索”**，进行最佳取样量摸索。确定最佳取样量后再按下表进行正式实验。（余下的红细胞抽提液可放冰箱冷冻以备后用）。

[注] 大、小鼠可取内眦血，用玻璃毛细管从内眦部斜向咽喉方向刺入，或者剪尾取血，将血滴在含肝素并烤干的玻片上（烤干时温度要低于 60℃），再用移液器

取 50 μ L 血，作 SOD 抽提。血量少时可取 10~20 μ L 抗凝全血。（做慢性动物试验，在饲养过程中可以反复取血 5~6 次）

2、操作步骤：

试 剂	测 定 管	对 照 管
试剂一应用液(mL)	1.0	1.0
样品(mL)	a*	
蒸馏水(mL)		a*
试剂二(mL)	0.1	0.1
试剂三(mL)	0.1	0.1
试剂四应用液(mL)	0.1	0.1

用旋涡混匀器充分混匀，置 37℃ 恒温水浴或气浴孵育 40 分钟

显色剂(mL)	2	2
---------	---	---

混匀，室温放置 10 分钟，波长 550nm，1cm 光径，蒸馏水调零，分光光度计比色（或每管取 200 μ L（同时设一孔加 200 μ L 蒸馏水用于调零）酶标仪 550nm 处读数）。

3、红细胞中 SOD 活力的计算公式：

定义：每克血红蛋白在 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)。

计算公式:

$$\text{样本SOD抑制率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$$\text{红细胞SOD活力 (U/g血红蛋白)} = \frac{\text{样本SOD抑制率 (\%)}}{50\%} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{\text{抽提液总量}}{\text{采血量}} \div \text{血红蛋白浓度 (g/mL)}$$

注: 采血量为0.05mL;

50 μ L 的全血进行红细胞的 SOD 抽提, 得抽提液总量 0.3mL;

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, (3.30+ a*) mL;

$V_{\text{样}}$: 样本加入量, (a*) mL;