

超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒【测总 SOD (Cu-Zn, Mn, 总)】

说明书修改日期: 2019.07.18

Cat number: KGT00150-1/KGT00100-1

Store at 4℃ for six months

For Research Use Only (科研专用)

一. 试剂盒的介绍

本试剂盒采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase) 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、生物、药物、食品、饮料、化妆品中的 SOD 活力。

二. 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。

三. 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。

四. 实验中所需的仪器和自备的试剂

1. 550nm 的分光光度计
2. 37℃ 恒温水浴锅
3. 台式离心机
4. 微量式移液器
5. 蒸馏水
6. 冰醋酸 (分析纯)

五. 试剂盒有效期和保存条件

本试剂盒保存期：6个月；储存温度：4℃，注意 buffer D 不可放置 0℃ 以下，否则酶容易失效，所用塑料吸嘴要干净，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。

六. 试剂的组成与配制

组份	KGT00150-1 48T	KGT00100-1 96T	保存温度
buffer A	5ml	10ml	4℃
buffer B	5ml	10ml	4℃
buffer C	5ml	10ml	4℃
buffer D	350μl	350μl*2	4℃
buffer D 稀释液	5ml	10ml	4℃
粉剂 E	1支	1支	4℃避光
粉剂 F	1支	1支	4℃避光
Buffer G	15ml	30ml	4℃

注：

1、Buffer A 工作液：贮备液：（天冷时或放冰箱会有部分结晶析出，需热水浴溶解后再用）；

Buffer A 应用液的配制：用时每瓶加蒸馏水稀释至 100ml，4℃。

96T	10ml
48T	5ml

2、Buffer D 工作液：用时和 Buffer D 稀释液按 1：14 稀释，即用即配。配好的工作液 4℃ 保存，不可冷冻。配好后可保存 2-3 个月。注：所用吸嘴最好为一次性吸嘴。

3、试剂 E：用时加 70℃-80℃ 热双蒸水 75ml 溶解后备用，若加热过程中水分蒸发减少，此时必须用蒸馏水补水至 75ml，配好后的试剂避光 4℃ 冷藏 1 年（不同规格参照下表）

96T	75ml
48T	37.5ml

4、试剂 F：用时加蒸馏水 75ml 溶解后备用。

96T	75ml
48T	37.5ml

显色剂的配制：按照试剂 E：试剂 F：冰乙酸=3：3：2 的体积比配成显色剂，即用即配。配好的显色剂 4℃ 避光冷藏 3 个月。

注：试剂 E，试剂 F 必须分开进行配制，切不可将试剂 E，试剂 F 混合后再进行配制，否则不显色。

七. 实验操作步骤

1、对于测定分型所用的样本上清前处理办法：取样本 0.2ml 加 Buffer G 0.2ml，涡旋混匀 1 分钟，以 3500~4000 转/分，离心 15 分钟，取上清进行 CuZn-SOD 测定。此上清即为经过处理的样本，Mn-SOD 的活力丧失，而 CuZn-SOD 活力不受影响。

2、对照上清制备：取生理盐水 0.2ml 加 Buffer G 0.2ml，涡旋混匀 1 分钟，以 3500-4000 转/分，离心 15 分钟，取上清作 CuZn-SOD 的对照上清。

3、注意：如样本量不够可按照比例减少样本和试剂的用量；总 SOD 测定不需要进行前处理。

试 剂	T-SOD 对照管	T-SOD 测定管	CuZn-SOD 对照管	CuZn-SOD 测定管
Buffer A 应用液 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
样品(ml)		a		
蒸馏水 (ml)	a			
对照上清			a	
前处理样本上清				a
Buffer B (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
Buffer C (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
Buffer D 工作液 (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 40 分钟				
显色剂 (ml)	2	2	2	2

混匀，室温放置 10 分钟，于波长 550nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

注意

注 1：a*代表样本取样量和蒸馏水取样量。

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的关系（附录：SOD 标准曲线），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。

最佳取样量的摸索

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。例如向测 1% 脑组织匀浆，取样量分别为 10 μ l、30 μ l、50 μ l，然后计算（对照管吸光度-测定管吸光度） \div 对照管吸光度的结果应该在 0.15-0.55 之间，即百分抑制率在 15-55% 之间（此段曲线基本呈直线关系，然后取百分抑制率在 48%-50% 左右的一管作为最佳取样量，若百分抑制率大于 60% 时（曲线的平坦部分），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 检验中常常无显著性差异。

注 3：最佳取样量参考值：

1. 红细胞抽提液一般为 8.0 μ l-10 μ l；
2. 大鼠红细胞抽提液为 5 μ l 左右；
3. 血浆（血清）一般为 30 μ l；
4. 小鼠血浆（血浆）5 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；

所有的样本用生理盐水稀释 1 倍后则取样量可加大 1 倍。

八. 实验结果计算

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

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

2、血清(浆)、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等总 SOD 活力计算公式:

$$SOD\text{活力 (U/ml)} = \frac{\text{对照吸光度} - \text{测定吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \times \text{样本测试前的稀释倍数}$$

3、计算举例:

测人血浆中总 SOD 的活力, 取未经处理的人血浆 30 μ l, 测得对照管吸光度为 0.526, 测定管吸光度为 0.255。将数据带入计算公式:

$$T-SOD\text{活力 (U/ml)} = \frac{0.526 - 0.255}{0.526} \div 50\% \times \frac{3.33(\text{反应液总量})}{0.03} = 114.38\text{U/ml (活力单位/毫升)}$$

CuZn-SOD 测定: 血浆经前处理后, 取 30 μ l 测铜锌 SOD 测定管为 0.365, 生理盐水组的对照管上清 OD 值为 0.540, 将数据带入计算公式:

$$CuZn-SOD\text{活力 (U/ml)} = \frac{0.540 - 0.365}{0.540} \div 50\% \times \frac{3.33(\text{反应液总量})}{0.03} = 71.94\text{U/ml (活力单位/毫升)}$$

(二)、组织匀浆中总 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:

$$\text{组织匀浆中SOD活力 (U/mgprot)} = \frac{\text{对照吸光度} - \text{测定吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量 (ml)}} \div \text{组织中蛋白含量 (mgprot/ml)}$$

*mgprot 为毫克蛋白数。

3、计算举例:

取 1%肝组织匀浆 10 μ l 测总 SOD 的活力, 对照管吸光度为 0.510, 测定管的吸光度为 0.242, 测得组织蛋白为 1.075mg/ml。则计算结果为:

$$\text{总SOD活力 (U/mgprot)} = \frac{0.510 - 0.242}{0.510} \div 50\% \times \frac{3.31}{0.01} \div 1.075 = 323.60 \text{ U/mgprot}$$

本法优点

- 1、快速：整个操作过程约 50 分钟，在这期间可测 100 例以上样本。这种短时大批量的测试方法很受操作人员的欢迎。
- 2、取样量极微：本法取手指或耳垂等末稍血 20 μ l-50 μ l 即可测红细胞中的 SOD，只需 2ml 静脉血可测白细胞中的 SOD 及血小板中 SOD，只需 6mg 组织就可测组织血浆、胞浆、0.2g 组织可测线粒体及微粒中的 SOD，因此，本法受到科研人员的欢迎。
- 3、灵敏度高：ID50=0.05g/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、稳定性好：试剂放在 0 $^{\circ}$ C-4 $^{\circ}$ C 冰箱中可保存 6 个月。取混合血清放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，三天内 SOD 活力不变。
- 5、再现性好：变异系数 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。
- 6、回收试验：
- 7、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。
- 8、测试面广：即可测 T-SOD 又可测得 Mn-SOD 也可测得 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、离心心肌灌流液、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。
- 9、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。
- 10、不需要昂贵或特殊的仪器，只需恒温水浴箱与 721、722、751、752 等可见分光光度计。用简单的仪器测出高水平的指标。
- 11、最佳取样量参考值：
 - ① 红细胞抽提液：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）为：20 μ l 左右；
 - ⑤ 1%组织匀浆为：30~50 μ l；
 - ⑥ 胞浆：20~50 μ l；
 - ⑦ 心肌灌流或肾透析液：100~200 μ l；
 - ⑧ 白细胞悬液：100~200 μ l；
 - ⑨ 细胞培养液：100~200 μ l。