

总超氧化物歧化酶（T-SOD）测试盒

羟胺法 50 管/48 样

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（ $O_2^- \cdot$ ）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（ $O_2^- \cdot$ ），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),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 4 号贮备液需-20℃以下冻存（温度越低保存时间越长），否则容易失效，所用塑料吸嘴尖要干净，最好消毒，或者用蒸馏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。

实验中所需的仪器和自备的试剂

- 1.550nm 的分光光度计或酶标仪
- 2.37℃恒温水浴或气浴箱
- 3.离心机
- 4.微量移液器
- 5.蒸馏水
- 6.冰醋酸（分析纯，乙酸浓度 $\geq 99.5\%$ ）

试剂组成与配制

1、试剂盒的组成与配制：

试剂一：贮备液：5ml \times 1 瓶（天冷时或放冰箱会有部分结晶析出，需热水浴溶解后再用）；

试剂一应用液的配制：用时 5ml 贮备液加蒸馏水稀释至 50ml，4℃保存 1 年。

试剂二：液体 5ml×1 瓶，4℃~10℃保存 1 年。

试剂三：液体 5ml×1 瓶，4℃~10℃保存 1 年。

试剂四：贮备液：350 μl×1 支，-20℃以下保存；

稀释液：5ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。

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。

试剂五：粉剂×1 支，用时加蒸馏水 37.5ml，加热至 70℃~80℃溶解后备用，若加热过程中水分蒸发减少，此时必须用蒸馏水补充至 37.5ml，配好后的试剂避光 4℃冷藏 1 年。

试剂六：粉剂×1 支，用时加蒸馏水 37.5ml 溶解后备用，配好后试剂避光 4℃冷藏保存 6 个月。

显色剂的配制：按试剂五：试剂六：冰乙酸=3:3:2 的体积比配制，用多少配多少，配好的显色剂 4℃避光也可冷藏 3 个月。

2、试剂盒的组成与配制：

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℃溶解后再用）；

试剂一应用液的配制：用时 10ml 贮备液加蒸馏水稀释至 100ml，4℃保存 1 年。

试剂二：液体 10ml×1 瓶，4℃~10℃保存 1 年。

试剂三：液体 10ml×1 瓶，4℃~10℃保存 1 年。试剂四：贮备液：350 μl×2 支，-20℃以下保存；稀释液：10ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。

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。

试剂五：粉剂×1 支，用时加蒸馏水 75ml，加热至 70℃~80℃溶解后备用，若加热过程中水分蒸发减少，此时必须用蒸馏水补充至 75ml，配好后的试剂避光 4℃冷藏 1 年。

试剂六：粉剂×1 支，用时加蒸馏水 75ml 溶解后备用，配好后试剂避光 4℃冷藏保存 6 个月。

显色剂的配制：按试剂五：试剂六：冰乙酸=3:3:2 的体积比配制，用多少配多少，配好的显色剂 4℃避光也可冷藏 3 个月。

总超氧化物歧化酶（T-SOD）活力的测定

一、操作表：

试 剂	测 定 管	对 照 管
试剂一应用液(ml)	1.0	1.0
样品(ml)	0.05	
蒸馏水(ml)		0.05
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 40 分钟		
显色剂(ml)	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，比色。		

二、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：

$$\text{总 SOD 活力 (U/ml)} = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应体系的}}{\text{稀释倍数}} \times \frac{\text{样本测试前的}}{\text{稀释倍数}}$$

(二) 、动物组织匀浆中总 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：

$$\text{总 SOD 活力 (U/mgprot)} = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积 (ml)}}{\text{取样量 (ml)}} \times \frac{\text{相同匀浆浓度下的蛋}}{\text{白含量 (mgprot/ml)}}$$

[注]: *mgprot 为毫克蛋白数。

(三)、植物组织匀浆中总 SOD 活力计算：

1、方法一(根据组织匀浆浓度进行换算)：

定义：每克组织在 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：

$$\text{总 SOD 活力 (U/克组织湿重)} = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积 (ml)}}{\text{取样量 (ml)}} \times \frac{\text{匀浆液浓度}}{\text{度 (g/ml)}}$$

[注]: 匀浆液浓度 = $\frac{\text{组织湿重(g)}}{\text{匀浆介质体积(ml)}}$

2、方法二(根据蛋白浓度进行换算)：

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）。

计算公式：

总 SOD 活力	$\frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}}$	$\div 50\% \times$	$\frac{\text{反应液总体积 (ml)}}{\text{取样量 (ml)}}$	\times	$\frac{\text{相同匀浆浓度下的蛋}}{\text{白含量 (mgprot/ml)}}$
(U/mgprot)					

[注]: * mgprot 为毫克蛋白数。

注意 点

- 1、 在测微量样品时，例如心肌培养细胞、肿瘤培养细胞、白细胞、血小板、线粒体、微粒体或离体心肌灌流液等。可使用一次性塑料试管或园柱孔形酶标板操作，本公司有售。
- 2、 所有试剂的配制均可在测试前一天进行（试剂四除外），目的使其充分溶解。配好后的试剂，4℃可以保存 3~6 个月，测试前从冷藏箱中拿出的试剂及样品要在室温中放 30 分钟稳定至室温后再用。
- 3、 为避免测试误差，第一次吸的试剂要丢弃，用作冲洗管道，吸嘴外周若挂有液体要用滤纸轻轻擦干，样品和试剂要垂直加入试管，不要加在管壁上（因试剂及样品量小）。水浴或气浴前要用旋涡混匀器充分混匀。
- 4、 每次孵育时间为 40 分钟，当室温低于 20℃时孵育时间可适当延长至 45 分钟，孵育温度 37℃要固定。
- 5、 对照管要做 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。
- 6、 同一份标本测 T-SOD 与 Mn-SOD 或者是测 T-SOD 与 CuZn-SOD 时，或者是测 T-SOD 与 Fe-SOD 时只需测其中一对即可以。高等动物体中只有二种 SOD 即铜锌 CuZn-SOD 与锰 Mn-SOD，二者相加等于总 T-SOD。所以 T-SOD 减去 Mn-SOD 等于 CuZn-SOD；T-SOD 减去 CuZn-SOD 等于 Mn-SOD。单细胞动物及植物中还含有 Fe-SOD。因此 T-SOD 减去 Mn-SOD 再减去 CuZn-SOD 等于 Fe-SOD。
- 7、 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，以我们举例的取样量为中间值取上下 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：
对照管 OD 测定管 OD 结果应该在 0.15~0.55 之间，即百分抑制率在 15~55%对照管 OD 之间，然后取百分抑制率在 45%或 48%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，则需将样品浓度稀释后再测试。若百分抑制率小于 20% 时，则需将样品量加大后测试。
- 8、 EDTA 会螯合重金属酶，导致 SOD 活性降低，甚至测定不出，所以在用抗凝剂收集血浆时，不能用 EDTA 作为抗凝剂。

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是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梢血 5 μ l~10 μ l 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：IC50=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℃~4℃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。
- 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： $X \pm SD = 103.3 \pm 2.63\%$
- 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 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，效果均很好，并可测植物叶、根、茎，及水产品、化妆品、营养品及酒、饮料中 SOD。

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，只需恒温孵育箱与可见光分光光度计或酶标仪等简单的仪器测出高水平的指标。

另附实验方法学

内容有红细胞 SOD 的提取法、白细胞、血小板的提取法、及组织匀浆的制备、线粒体、微粒体的提取，微量蛋白的测定。红细胞膜及心肌细胞膜的制备，及自由基的概述、自由基的关系等参考资料，需要者可来电来函联系。我们一定紧密配合您的科研工作。欢迎大家采用我们的试剂盒。

需要试剂的用户可来人或来电来函订购，我们可邮寄或送货上门。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。