

总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测定试剂盒

说明书 (精简版)

(货号: A001-1 羟胺法)

● 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. 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)
2. 37℃ 恒温水浴或气浴箱及电炉 (配试剂加热用)
3. 低速 (4000rpm/min) 离心机
4. 各种规格微量移液器
5. 蒸馏水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)
6. 冰醋酸 (分析纯, 乙酸浓度 ≥ 99.5%)
7. 蛋白测定试剂 (组织或细胞用, 本公司有售)

● 试剂组成与配制

1、50 管/48 样试剂盒的组成与配制: (货号: A001-1-1)

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

试剂二: 液体 5mL × 1 瓶, 4℃ ~ 10℃ 保存。

试剂三: 液体 5mL × 1 瓶, 4℃ ~ 10℃ 保存。

试剂四: 贮备液: 350μL × 1 支, -20℃ 以下保存; 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, 现配现用。

试剂五: 粉剂 × 1 支, 用时加蒸馏水 37.5mL, 加热至 70℃ 以上溶解后备用, 若加热过程中水分蒸发减少, 此时须用蒸馏水补充至 37.5mL, 配好后的试剂避光 4℃ 可长期保存。

试剂六: 粉剂 × 1 支, 用时加蒸馏水 37.5mL 常温溶解后备用, 配好后试剂避光 4℃ 可长期保存。

显色剂的配制: 按试剂五溶液: 试剂六溶液: 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、100 管/96 样试剂盒的组成与配制: (货号: A001-1-2)

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: 用时按 1:9 的体积比加蒸馏水稀释, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 10mL × 1 瓶, 4℃ ~ 10℃ 保存。

试剂三: 液体 10mL × 1 瓶, 4℃ ~ 10℃ 保存。

试剂四: 贮备液: 350μL × 2 支, -20℃ 以下保存; 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, 现配现用。

试剂五: 粉剂 × 1 支, 用时加蒸馏水 75mL, 加热至 70℃ 以上溶解后备用, 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℃ 可长期保存。

试剂六: 粉剂 × 1 支, 用时加蒸馏水 75mL 常温溶解后备用, 配好后试剂避光 4℃ 可长期保存。

显色剂的配制: 按试剂五溶液: 试剂六溶液: 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。

● 操作步骤

一、样本前处理:

- 1、血清 (浆)、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等样本可直接使用。
- 2、动物组织: 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 0.86% 或 0.9% 的生理盐水), 冰水浴条件下, 机械匀浆, 制备成 10% 的匀浆液, 3000 转/分钟, 离心 10 分钟。
- 3、高脂血症血清 (浆) 样本的前处理:
 - ①、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;
 - ②、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;
 - ③、重度高脂血症: 取 50μL 高脂血清 (浆) 加生理盐水 200μL 混匀后, 加无水乙醇 150μL, 充分混匀 1 分钟, 再加入三氯甲烷 150μL, 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。
- 4、红细胞样本的前处理 (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 50μL, 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 5~20μL 参照 Page8 注意, 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 50μL 血，作 SOD 抽提。血量少时可取 10~20μL 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）

5、植物样本前处理：参照随货附送的《实验方法学》上组织匀浆的制备：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 0.1mol/L PH7.0~7.4 磷酸盐缓冲液)，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，取上清液进行测定；有些药材或植物粉末可用同样的方法进行处理；取得的上清液待测。

（以上制备好的样本先按照“●注意事项”选取 2 例样本进行最佳取样浓度摸索，确定最佳取样浓度后再进行正式实验）

二、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。		

三、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（或细胞）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：

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

[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：

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

[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：

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

[注]：* mgprot 为毫克蛋白数。

●注意事项

注 1：试剂五、试剂六必须分开进行配制(切不可将试剂五、试剂六混合后再进行配制),否则不显色。

注 2：最佳取样浓度因样品种类不同，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（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 3：按照操作表顺序加试剂，试剂一可以与试剂二、或试剂一与试剂三混合，混合试剂可以加 1mL，不影响结果。但不可将试剂一、二、三、四混合，会影响结果。

最佳取样浓度的确定：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。分别以我们举例的取样浓度为中间值再往上浓缩一倍和往下稀释一倍做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。

抑制率的计算：(对照管吸光度-测定管吸光度)÷对照管吸光度 × 100%

抑制率范围：百分抑制率在 15~55%之间（此段曲线基本呈正比曲线关系）。

最佳取样浓度的选择：取抑制率在 45%~50%左右的这一管的样本浓度作为最佳取样浓度。

最佳取样浓度的调整：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常常无显著性差异。

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增加取样量到 100~200μL；
- ⑧白细胞悬液增加取样量到 100~200μL；
- ⑨细胞培养液增加取样量到 100~200μL。

所有样本用生理盐水或缓冲液稀释 1 倍后则取样量可加大 1 倍。

●样本正常参考值

○ 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 ±31.60U/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 (Hummer)**
- **血清** T-SOD 活力: 104.2 ±18.8U/mL (n=100 人, 2 倍稀释); Mn-SOD 活力: 41.21 ± 3.2U/mL (n=100 人, 2 倍稀释);
- **红细胞** T-SOD 活力: 19246 ±132U/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。

●操作注意点

- 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圆柱孔形酶标板操作, 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:
$$\frac{\text{对照管OD} - \text{测定管OD}}{\text{对照管OD}}$$
结果应该在 0.15~0.55 之间, 即百分抑制率在 15~55%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 5μL~10μL 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:** 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℃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:** $\bar{X} \pm SD = 103.3 \pm 2.63\%$
- 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。
- 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。