（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K022-S

产品规格：50 assays(25 samples)/100 assays(50 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计（550 nm）

Elabscience®分型超氧化物歧化酶（CuZn-SOD/Mn-SOD）测试盒(羟胺法)

CuZn/Mn Superoxide Dismutase (CuZn-SOD/Mn-SOD) Activity Assay Kit (Hydroxylamine Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

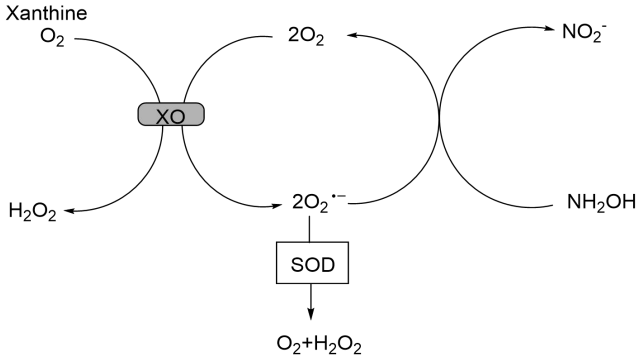
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

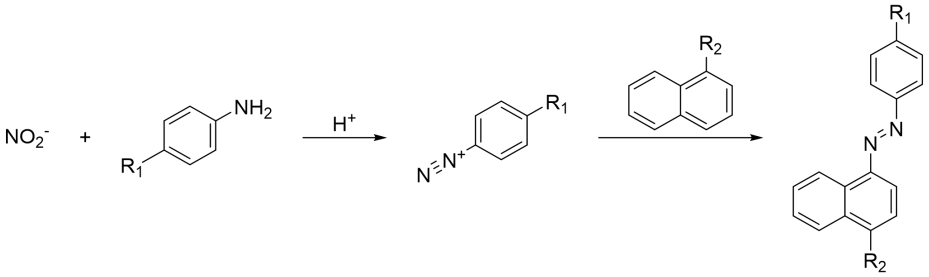
用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、尿液、细胞及细胞上清、各种动植物组织中的 T-SOD、CuZn-SOD 及 Mn-SOD 活力。

检测原理

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（$O_2^{\cdot-}$），它氧化羟胺形成亚硝酸盐，在显色剂作用下产生紫红色化合物。当反应体系中加入 SOD 后，催化超氧阴离子自由基发生歧化反应，使形成的亚硝酸盐减少，进而产生的紫红色变浅。根据样品管与对照管中的吸光度差值，来计算 SOD 的活性。高等生物细胞内含有有铜锌-SOD（CuZn-SOD）和锰-SOD（Mn-SOD）同时，经样本前处理过程的样本中 Mn-SOD 活力丧失，但 CuZn-SOD 活力不变。





本试剂盒检测组织及细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1(Size 1)（50 assays）	规格 2(Size 2)（100 assays）	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	亚硝基发生剂 (Nitrosogenic Agent)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	基质液 (Substrate Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶储备液 (Enzyme Stock Solution)	0.3 mL×1 支	0.6 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	显色剂 C (Chromogenic Agent C)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	提取液 (Extracting Solution)	12.5 mL×1 瓶	25 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。本试剂盒规格 1 如果只测 CuZn-SOD 可以测定 25 样；规格 2 如果只测 CuZn-SOD 可以测定 50 样。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计（550 nm）、恒温箱、微量移液器（1000 μL，200 μL，100 μL，10 μL）、离心机。

耗材：枪头（1000 μL，200 μL，10 μL ）、EP 管（1.5、5 mL）。

试剂：双蒸水、生理盐水(0.9%NaCl)。

试剂准备

① 检测前，将试剂四置于冰盒上缓慢融化，混匀，试剂盒中的其他试剂平衡至室温。

② 试剂一应用液配制：

将试剂一：双蒸水按照1: 9的体积比稀释，2-8℃保存3个月。

③ 试剂四应用液配制：

在冰盒上操作，按照试剂四：试剂五为1: 19的体积比配制，现用现配，未用完的试剂2-8℃可保存3天。

④ 试剂六应用液配制：

将试剂六加入90 mL 70-80℃双蒸水中，搅拌溶解，2-8℃避光保存3个月。（若加热过程中水分蒸发减少，必须补双蒸水至90 mL）。

⑤ 试剂七应用液配制：

将试剂七加入90 mL双蒸水溶解，2-8℃避光保存1个月。如果您一次用不完，可以取部分固体按1.5 mg/mL的浓度配制。

⑥ 显色剂的配制：

按照试剂六应用液：试剂七应用液：试剂八为3: 3: 2的体积比配制，现用现配，配好的显色剂2-8℃避光保存。

样本准备

① 样本处理

样本要求：样本中不能含有SDS、Tween20、NP-40、Triton X-100等去污剂，不能含有DTT、2-巯基乙醇等还原性试剂。

血清(浆)等液体样本：稀释合适倍数后，直接测定。

组织样本：常规匀浆处理(生理盐水（0.9% NaCl）)。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取 10^6 细胞加入 300-500 μL 生理盐水（0.9% NaCl）进行匀浆。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本最佳加样量X的选择

在正式检测前，需选择2-3个预期差异较大的样本设置不同的取样量，按操作表进行预实验，以确定最佳取样量。不同样本稀释如下表（仅供参考）。

样本	稀释倍数	上样量（μL）
小鼠血清	3-5	20-30
人血清	不稀释	30-40
大鼠血清	3-5	20-30
大鼠血浆	1-2	20-30
人胸水	不稀释	30-50
人尿液	不稀释	30-50
10%小鼠肝匀浆	50-80	20-30
10%小鼠脑匀浆	8-12	20-30
10%小鼠肾匀浆	10-20	20-30
HepG2 细胞（3.27 mgprot/mL）	5-10	20-30

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

③ 最佳加样量确定

本试剂盒可检测SOD抑制率范围在15%-55%之间，最佳抑制率范围25%-45%， 其对应的加样量为最佳加样量。

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

④ 最佳取样量的调整

若SOD抑制率大于55%，需将样本稀释或减少取样量后再测试；若SOD抑制率小于15%，需增加取样量后再测试。

实验关键点

① 37℃孵育时间为 40 min，当室温低于 20℃时，可适当延长孵育时间至 45 min。

② 样本与试剂九混合后的混匀要充分，保证 1 min。

操作步骤

① CuZn-SOD 上清液制备：

测定管上清液：取 0.1 mL 样本加 0.1 mL 试剂九于 1.5 mL EP 管中，旋涡混匀器充分混匀 1min 后，3500 × g 离心 15 min，取上清进行。

对照管上清液：取 0.1 mL 生理盐水加 0.1 mL 试剂九于 1.5 mL EP 管中，旋涡混匀器充分混匀 1 min 后，3500 × g 离心 15 min，取上清液待测。

② T-SOD 测定管：取 1 mL 试剂一应用液，X mL 未经处理的待测样本，加入 5 mL EP 管；

T-SOD 对照管：取 1 mL 试剂一应用液，X mL 双蒸水，加入 5 mL EP 管；

CuZn-SOD 测定管：取 1 mL 试剂一应用液，X mL 测定管上清液，加入 5 mL EP 管；

CuZn-SOD 对照管：取 1 mL 试剂一应用液，X mL 对照管上清液，加入 5 mL EP 管。

③ 向步骤②中各管中，依次加入 0.1 mL 试剂二、0.1 mL 试剂三、0.1 mL 试剂四应用液。

④ 旋涡混匀后，37℃孵育 40 min。

⑤ 向步骤④中的各管加入 2 mL 显色剂。

⑥ 混匀，室温静置 10 min，550 nm 波长，双蒸水调零，1 cm 光径石英比色皿，测其吸光度。

注：如果样本的最佳取样量 X 相同，可只做一个对照管。

操作表

	T-SOD 测定管	T-SOD 对照管	CuZn-SOD 测定管	CuZn-SOD 对照管
试剂一应用液（mL）	1.0	1.0	1.0	1.0
样本（mL）	X			
双蒸水（mL）		X		
测定管上清液			X	
对照管上清液				X
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
涡旋充分混匀，37℃ 孵育 40 min				
显色剂（mL）	2.0	2.0	2.0	2.0
混匀，室温静置 10 min，550 nm 波长，双蒸水调零，1 cm 光径石英比色皿，测其吸光度。				

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

血清（浆）、细胞培养液等液体样本：

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）。

$$\text{T-SOD 活力（U/mL）} = i_1 \div 50\% \times \frac{V_1}{V_2} \times f$$

$$\text{CuZn-SOD 活力（U/mL）} = i_2 \div 50\% \times \frac{V_1}{V_2} \times f$$

组织及细胞样本：

定义：每毫克组织蛋白在 1 mL 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）。

$$\text{T-SOD 活力（U/mgprot）} = i_1 \div 50\% \times \frac{V_1}{V_2} \times f \div C_{pr}$$

$$\text{CuZn-SOD 活力（U/mgprot）} = i_2 \div 50\% \times \frac{V_1}{V_2} \times f \div C_{pr}$$

$$\text{Mn-SOD 活力} = \text{T-SOD 活力} - \text{CuZn-SOD 活力}$$

注解：

i_1：T-SOD 抑制率，

$$\text{T-SOD 抑制率（\%）} = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100\%$$

i_2：CuZn-SOD 抑制率

$$\text{CuZn-SOD 抑制率（\%）} = \frac{(A_3 - A_4)}{A_3} \times 100\%$$

A_1：T-SOD 对照管 OD 值

A_2：T-SOD 测定管 OD 值

A_3：CuZn -SOD 对照管 OD 值

A_4：CuZn -SOD 测定管 OD 值

V_1：反应液总体积（mL）

V_2：加入样本的体积（mL）

C_{pr}：待测样本蛋白浓度（mgprot/mL）

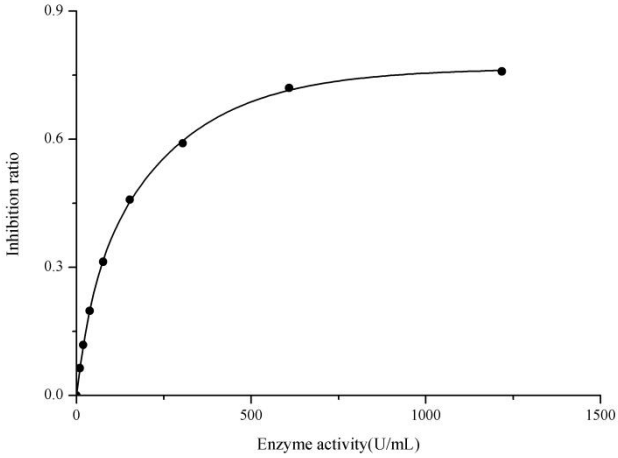
f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	2.03-155 U/mL	平均批间差	7.2 %
灵敏度	2.03 U/mL	平均批内差	4.0 %
平均回收率	96 %		

2. 抑制率曲线（数据仅供参考）



附录2 实例分析

例如检测小鼠心组织(数据仅供参考)：

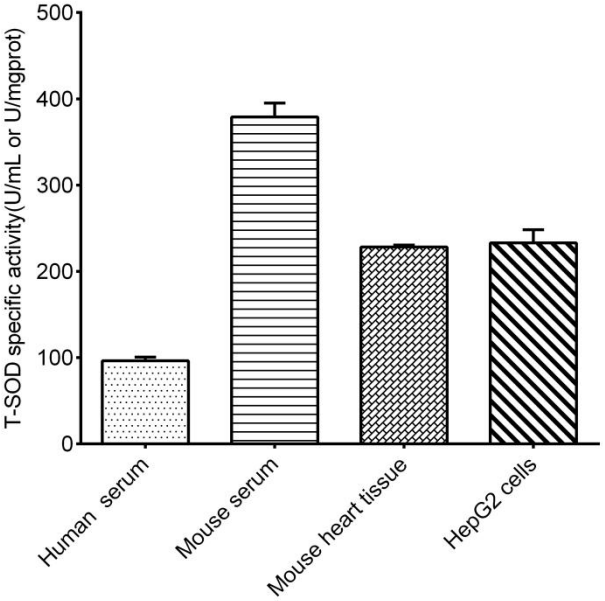
T-SOD测定：取制备好的10%小鼠心组织，用生理盐水（0.9%NaCl）稀释10倍，取20 μL稀释后样本按操作表操作，结果如下：测定孔平均OD值为0.252，对照孔平均OD值为0.522，同时测得10%小鼠心匀浆蛋白含量6.84 mgprot/mL，则计算结果为：

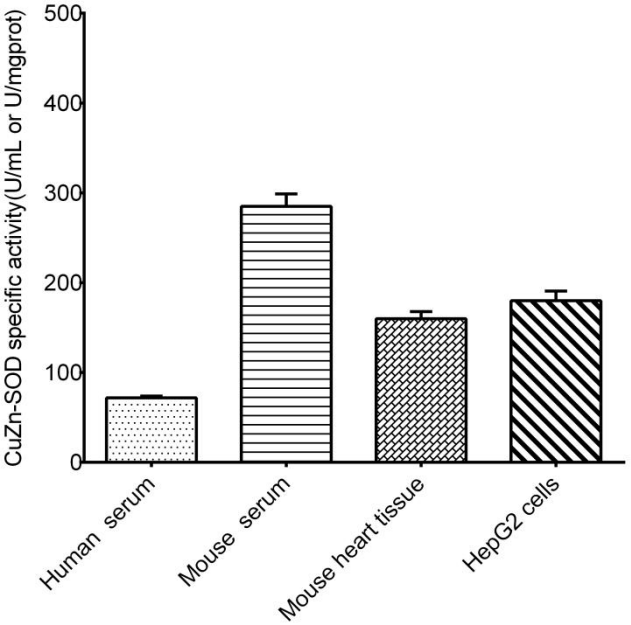
$$\text{T-SOD活力（U/mgprot）} = \left(\frac{0.522-0.252}{0.522}\right) \div 50\% \times \frac{3.02}{0.02} \times 10 \div 6.84 = 228.37\ \text{U/mgprot}$$

CuZn-SOD测定：稀释10倍的小鼠心匀浆经试剂九处理后，取20 μL上清按操作表操作，结果如下：测定孔平均OD值为0.365，对照孔平均OD值为0.571，同时测得10%小鼠心匀浆蛋白含量6.84 mgprot/mL，则计算结果为：

$$\text{CuZn-SOD 活力（U/mgprot）} = \left(\frac{0.571-0.365}{0.571}\right) \div 50\% \times \frac{3.02}{0.02} \times 10 \div 6.84 = 159.29\ \text{U/mgprot}$$

按照说明书操作，测定人血清（加样量30 μL）、小鼠血清(稀释4倍，加样量20 μL）、小鼠心组织（10%组织匀浆的蛋白含量6.84 mgprot/mL，稀释10倍，加样量20 μL）、HepG2细胞（蛋白含量3.27 mgprot/mL，稀释10倍，加样量25 μL）中T-SOD和CuZn-SOD活力（如下图）：


T-SOD specific activity(U/mL or U/mgprot)
500
400
300
200
100
0
Human serum
Mouse serum
Mouse heart tissue
HepG2 cells


CuZn-SOD specific activity(U/mL or U/mgprot)
500
400
300
200
100
0
Human serum
Mouse serum
Mouse heart tissue
HepG2 cells

附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本加样量较低	增加加样量，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Barakat H, Alkabeer I A, Althwab S A, et al. Nephroprotective effect of fennel (Foeniculum vulgare) seeds and their sprouts on CCl4-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats[J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 325.

2. Dumitraş D A, Dreanca A I, Pall E, et al. Inhibition of tumor growth and modulation of antioxidant activity of rhodoxanthin isolated from Taxus baccata aril against B16F10 murine malignant melanoma[J]. Antioxidants, 2022, 11(11): 2264.

3. Barakat H, Alkabeer I A, Aljutaily T, et al. Phenolics and volatile compounds of fennel (Foeniculum vulgare) seeds and their sprouts prevent oxidative DNA damage and ameliorates CCl4-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats[J]. Antioxidants, 2022, 11(12): 2318.

4. Alharbi Y M, Sakr S S, Albarrak S M, et al. Antioxidative, antidiabetic, and hypolipidemic properties of probiotic-enriched fermented camel milk combined with Salvia officinalis leaves hydroalcoholic extract in streptozotocin-induced diabetes in rats[J]. Antioxidants, 2022, 11(4): 668.

5. Alharbi H F, Algonaiman R, Barakat H. Ameliorative and antioxidative potential of Lactobacillus plantarum-fermented oat (Avena sativa) and fermented oat supplemented with sidr honey against streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats[J]. Antioxidants, 2022, 11(6): 1122.

6. Aljutaily T. Evaluating the nutritional and immune potentiating characteristics of unfermented and fermented turmeric camel milk in cyclophosphamide-induced immunosuppression in rats[J]. Antioxidants, 2022, 11(4): 792.