

(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-M

产品规格: 48T(44 samples)/96T(92 samples)

检测仪器: 酶标仪 (530-570 nm)

Elabscience®分型超氧化物歧化酶

(CuZn-SOD/Mn-SOD) 试剂盒(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。

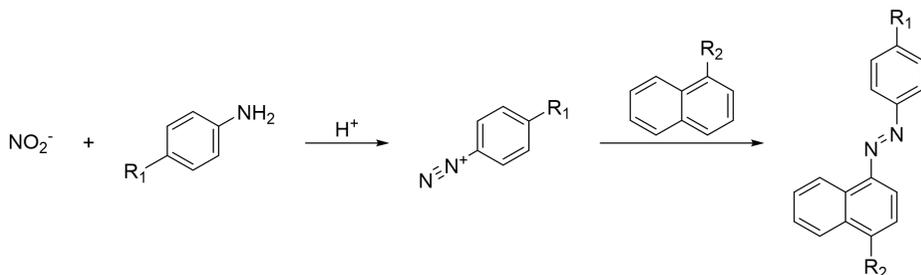
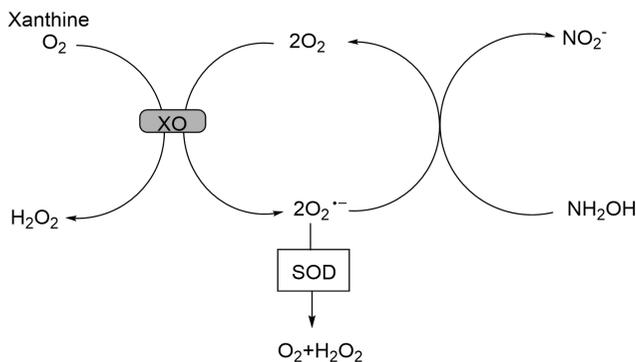
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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。同时，经过试剂处理的样本导致 Mn-SOD 失活，而不影响 CuZn-SOD。



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)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	亚硝基发生剂 (Nitrosogenic Agent)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	基质液 (Substrate Solution)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶储备液 (Enzyme Stock Solution)	0.03 mL×1 支	0.06 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	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 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	显色剂 C (Chromogenic Agent C)	6 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	提取液 (Extracting Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

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 44 样，若需要同时测定 Mn-SOD，可测定 20 样；规格 2 如果只测 CuZn-SOD 可以测定 92 样，若需要同时测定 Mn-SOD，可测定 44 样。

所需自备物品

仪器：酶标仪(530-570 nm, 最适检测波长 550 nm)、恒温箱、微量移液器(1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL)、离心机。

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 可保存3天。

④ 试剂六应用液配制:

向试剂六瓶中加入9 mL双蒸水, 拧紧瓶盖, 放入烘箱中65 $^{\circ}\text{C}$, 40 min, 充分溶解(或加入9 mL70-80 $^{\circ}\text{C}$ 双蒸水, 充分混匀溶解), 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存3个月。

⑤ 试剂七应用液配制:

向试剂七瓶中加入9 mL双蒸水溶解, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存1个月。

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 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存1个月。

⑦ 酶工作液配制:

在冰盒上操作, 按照试剂二: 试剂三: 试剂四应用液为1: 1: 1的体积比配制, 临用前配制, 配制完成后, 需要在20 min内使用。

⑧ 非酶工作液配制:

按照试剂二: 试剂三: 试剂五为1: 1: 1的体积比配制, 临用前配制, 配制完成后, 需要在20 min内使用。(只需要配制3孔的量即可)

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°C，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 10⁶ 细胞加入 300-500 μL 生理盐水 (0.9% NaCl) 进行匀浆。匀浆后，4°C，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 样本最佳稀释倍数的选择

在正式检测前，需选择2-3个预期差异较大的样本稀释成不同浓度，按操作表进行预实验，以确定最佳稀释倍数。不同样本稀释如下表（仅供参考）。

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
小鼠血清	5-10	HepG2 细胞 (5.21mgprot/mL)	15-25
大鼠血清	6-15	10%小鼠肝匀浆	100-200
尿液	2-3	10%小鼠脑匀浆	20-30
人胸水	2-3	10%小鼠肾匀浆	50-120
细胞上清	不稀释	10%大鼠肾匀浆	50-120

注：稀释液为生理盐水 (0.9% NaCl) 或PBS (0.01 M, pH 7.4)。

③ 最佳样本稀释倍数的确定

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 %。

$$\begin{aligned} \text{SOD 抑制率} &= \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照空白}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \times 100\% \\ (\%) &= \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \times 100\% \end{aligned}$$

④ 最佳样本稀释倍数的调整

若SOD抑制率大于55%，需将样本稀释后再测试；若SOD抑制率小于15%，减小稀释倍数后再测试。

实验关键点

酶工作液配制完成后，需要在 20 min 内使用。

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 1 min 后, $3500 \times g$ 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 1min 后, $3500 \times g$ 离心 15 min, 取上清液待测。

② T-SOD 空白孔: 取 5 μL 双蒸水加入到 T-SOD 空白孔中;

T-SOD 对照孔: 取 5 μL 双蒸水加入到 T-SOD 对照孔中;

T-SOD 测定孔: 取 5 μL 样本加入到 T-SOD 测定孔中。

CuZn-SOD 空白孔: 取 5 μL 对照管上清液加入到 CuZn-SOD 空白孔中;

CuZn-SOD 对照孔: 取 5 μL 对照管上清液加入到 CuZn-SOD 对照孔中;

CuZn-SOD 测定孔: 取 5 μL 测定管上清液加入到 CuZn-SOD 测定孔中。

③ 向步骤②中各孔加入 90 μL 试剂一应用液。

④ 向步骤③中的测定、对照孔中, 加入 30 μL 酶工作液。

向空白孔中加入 30 μL 非酶工作液。

⑤ 在酶标仪上震板 10 s, 盖上覆膜, 37°C 孵育 50 min。

⑥ 向步骤⑤中的各孔加入 180 μL 显色剂。

⑦ 在酶标仪上震板 10 s, 室温静置 10 min, 550 nm, 酶标仪, 测各孔吸光度值。

注: 对照、空白孔分别做 2 个孔即可。

操作表

	T-SOD 测定管	T-SOD 对照管	T-SOD 空白管	CuZn-SOD 测定管	CuZn-SOD 对照管	CuZn-SOD 空白管
样本(μL)	5					
双蒸水(μL)		5	5			
测定管上清液 (μL)				5		
对照管上清液 (μL)					5	5
试剂一应用液 (μL)	90	90	90	90	90	90
酶工作液(μL)	30	30		30	30	
非酶工作液 (μL)			30			30
在酶标仪上震板 10 s, 盖上覆膜, 37°C 孵育 50 min。						
显色剂(μL)	180	180	180	180	180	180
在酶标仪上震板 10 s, 室温静置 10 min, 550 nm, 酶标仪, 测各孔吸光度值。						

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)。

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

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

注解：

i_1 : T-SOD 抑制率,

$$\begin{aligned} \text{T-SOD 抑制率} \\ (\%) &= \frac{(A_1-A_3)-(A_2-A_3)}{A_1-A_3} \times 100\% = \frac{A_1-A_2}{A_1-A_3} \times 100\% \end{aligned}$$

i_2 : CuZn-SOD 抑制率

$$\begin{aligned} \text{CuZn-SOD 抑制率} \\ (\%) &= \frac{(A_4-A_6)-(A_5-A_6)}{A_4-A_6} \times 100\% = \frac{A_4-A_5}{A_4-A_6} \times 100\% \end{aligned}$$

A_1 : T-SOD 对照孔 OD 值

A_2 : T-SOD 测定孔 OD 值

A_3 : T-SOD 空白孔 OD 值

A_4 : CuZn-SOD 对照孔 OD 值

A_5 : CuZn-SOD 测定孔 OD 值

A_6 : CuZn-SOD 空白孔 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)

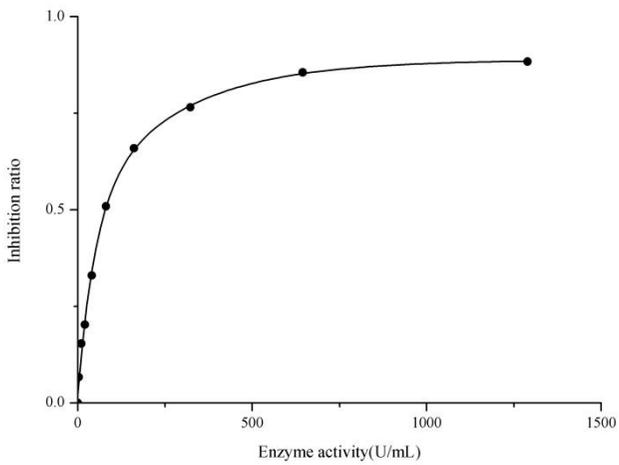
f : 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	1.35-62 U/mL	平均批间差	9.6 %
灵敏度	1.35 U/mL	平均批内差	5.1 %
平均回收率	99 %		

2. 抑制率曲线 (数据仅供参考)



附录2 实例分析

例如检测小鼠肝脏组织(数据仅供参考):

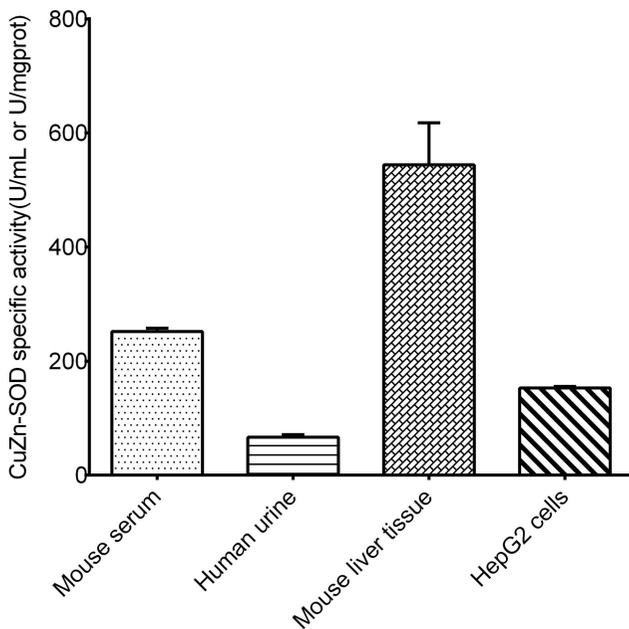
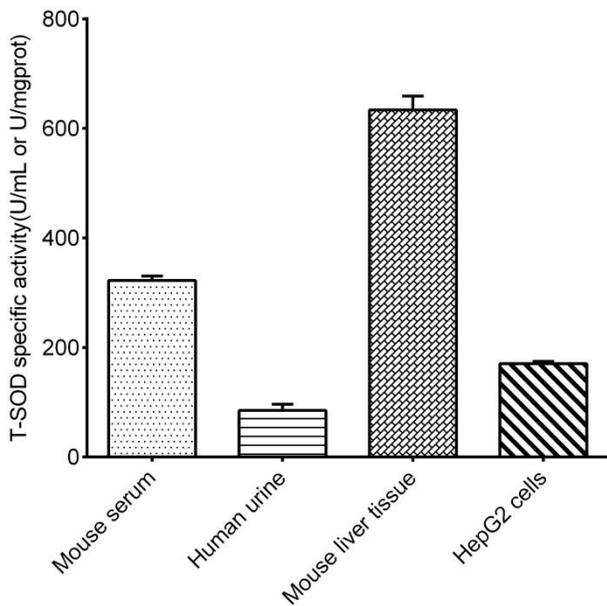
T-SOD测定: 取制备好的10%小鼠肝脏匀浆, 用生理盐水(0.9%NaCl)稀释150倍, 取5 μ L稀释后样本按操作表操作, 结果如下: 测定孔平均OD值为0.344, 对照孔平均OD值为0.546, 空白孔平均OD值为0.121, 同时测得10%小鼠肝脏匀浆蛋白含量13.72 mgprot/mL, 则计算结果为:

$$\text{T-SOD活力 (U/mgprot)} = \left(\frac{0.546-0.344}{0.546-0.121} \right) \div 50\% \times \frac{0.305}{0.005} \times 150 \div 13.72 = 633.96 \text{ U/mgprot}$$

CuZn-SOD测定: 稀释150倍的小鼠肝脏匀浆经试剂九处理后, 取5 μ L上清按操作表操作, 结果如下: 测定孔平均OD值为0.400, 对照孔平均OD值为0.590, 空白孔平均OD值为0.124, 同时测得10%小鼠肝脏匀浆蛋白含量13.72 mgprot/mL, 则计算结果为:

$$\text{CuZn-SOD活力 (U/mgprot)} = \left(\frac{0.590-0.400}{0.590-0.124} \right) \div 50\% \times \frac{0.305}{0.005} \times 150 \div 13.72 = 543.83 \text{ U/mgprot}$$

按照说明书操作, 测定小鼠血清(稀释5倍, 加样量5 μ L)、人尿液(稀释2倍, 加样量5 μ L)、小鼠肝脏组织(10%组织匀浆的蛋白含量13.72 mgprot/mL, 稀释150倍, 加样量5 μ L)、HepG2细胞(蛋白含量5.21 mgprot/mL, 稀释20倍, 加样量5 μ L)中T-SOD和CuZn-SOD活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值复孔差异大	酶工作液加样误差大	保证加样量一致
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. Li X, Chen J, Feng W, et al. Berberine ameliorates iron levels and ferroptosis in the brain of 3× Tg-AD mice[J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154962.
2. Tung Y T, Wu C H, Chen W C, et al. Ascophyllum nodosum and Fucus vesiculosus Extracts Improved Lipid Metabolism and Inflammation in High-Energy Diet–Induced Hyperlipidemia Rats[J]. *Nutrients*, 2022, 14(21): 4665.
3. Chen R, Gao S, Guan H, et al. Naringin protects human nucleus pulposus cells against TNF- α -induced inflammation, oxidative stress, and loss of cellular homeostasis by enhancing autophagic flux via AMPK/SIRT1 activation[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022(1): 7655142.
4. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236: 113494.
5. Yang L N, Xu S, Tang M, et al. The circadian rhythm gene Bmal1 ameliorates acute deoxynivalenol-induced liver damage[J]. *Archives of Toxicology*, 2023, 97(3): 787-804.
6. Lv D, Ji Y, Zhang Q, et al. Mailuoshutong pill for varicocele-associated male infertility—Phytochemical characterisation and multitarget mechanism[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 961011.

