

植物铜锌-超氧化物歧化酶($\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ -SOD)测定试剂盒

(货号: BC155 比色法 100 管/48 样)

一、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 ($\text{O}_2^{\cdot-}$), 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。

植物体中 SOD 可分为 3 种类型: 即铜锌-SOD (CuZn-SOD)、锰-SOD (Mn-SOD) 和铁-SOD (Fe-SOD)。低等植物以 Fe-SOD 和 Mn-SOD 为主, 高等植物以 CuZn-SOD 为主, CuZn-SOD 主要位于细胞质和叶绿体中, Mn-SOD 主要位于线粒体中, Fe-SOD 一般位于一些植物的叶绿体中。三者相加等于总 SOD (T-SOD)。经样本前处理过的样本中 Mn-SOD 和 Fe-SOD 活力丧失, 但 CuZn-SOD 活力不变。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期1年)

试剂	试剂名称	装量规格	保存条件
试剂一	缓冲贮备液	10mL×1 瓶	4℃
		(天冷时或放冰箱会有结晶析出, 需 37℃水浴溶解后再用)	
	试剂一应用液的配制: 用时每瓶加双蒸水 90mL 稀释, 配好后 4℃可保存 6 个月		
试剂二	底物液	10mL×1 瓶	4℃
试剂三	基质液	10mL×1 瓶	4℃
试剂四	酶贮备液	350μL×2 支	-20℃以下
	酶稀释液	10mL×1 瓶	4℃
	酶应用液的配制: 用时按酶贮备液: 酶稀释液 = 1 : 14 的比例进行配制, 需多少配多少。		
试剂五	粉剂×1 支		4℃
	试剂五的配制: 用时加双蒸水 75mL, 加热至 70℃~80℃溶解后备用, 若加热过程中水分蒸发减少, 此时必须用双蒸水补充至 75mL, 配好的试剂 4℃避光可冷藏 1 年		
试剂六	粉剂×1 支		4℃
	试剂六的配制: 用时加双蒸水 75mL 溶解后备用, 配好后 4℃冷藏避光可保存 3 个月		
显色剂	显色应用液的配制: 按试剂五: 试剂六:冰乙酸=3:3:2 的比例进行配制, 4℃避光可冷藏 3 个月。		
试剂七	CuZn-SOD 提取甲液	12mL×1 瓶	4℃避光密封
	CuZn-SOD 提取乙液	12mL×1 瓶	
试剂八	匀浆介质	60mL×2 瓶	4℃避光

[注]: 试剂四酶贮备液不要多次反复冻融,如需多次使用,请在第一次解冻后,分装好,用多少拿多少。

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或是酶标仪 (550±10nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 离心机, 37℃水浴锅 (或恒温箱), 冰乙酸 (醋酸, 浓度≥99.5%), 蒸馏水。

四、操作步骤:

1、20%植物组织匀浆液的制备: 准确称取植物组织 (0.2~0.5g), 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:4 的比例, 加入 4 倍体积的试剂八, 剪碎, 冰水浴条件下进行匀浆, 制备成 20% 的匀浆液, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

2、SOD 最佳取样量的摸索

地址: 武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼

吸取 20%匀浆上清液 0.1mL, 加入试剂八 0.2mL (稀释倍数为 3 倍), 混匀, 分别取 10μL、30μL、50μL 按操作表进行预试验, 以确定最佳取样量。

$$\text{抑制率计算公式: 抑制率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

最佳取样范围: 百分抑制率在 15~55%之间基本呈正比曲线关系。取百分抑制率在 45%~50%的某一管取样量作为最佳取样量。

最佳取样量的调整: 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。

[注]: 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 检验运行中常常无显著性差异。

3、CuZn-SOD的提取: 吸取与T-SOD所需浓度一致的匀浆上清0.1mL加入试管, 再加入CuZn-SOD提取甲液0.1mL以及CuZn-SOD提取乙液0.1mL (稀释倍数为2, CuZnSOD提取乙液不参与稀释), 漩涡混匀90秒, 静置5分钟, 3500转/分, 离心10分钟, 此时液体分为三层, 上层为无色透亮液体 (待测液体), 中层为蛋白层, 下层为无色透亮液体。取上层无色透亮液体按操作表进行操作 (CuZn-SOD的提取液的最佳取样量与T-SOD待测液通过预试验得到的最佳取样量相同即a*)

4、操作表:

	对照管	总 SOD 测定管	CuZn-SOD 测定管
试剂一应用液(mL)	1.0	1.0	1.0
匀浆介质(mL)	a*		
总 SOD 待测液(mL)		a*	
CuZnSOD 测定提取液(mL)			a*
试剂二(mL)	0.1	0.1	0.1
试剂三(mL)	0.1	0.1	0.1
试剂四应用液(mL)	0.1	0.1	0.1
用漩涡混匀器充分混匀, 置 37℃ 恒温水浴 40 分钟			
显色剂(mL)	2	2	2

混匀, 室温放置 10 分钟, 于波长 550nm 处, 1cm 光径比色杯, 双蒸水调零, 分光光度计测定各管吸光值 A (或是每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中 (且同时设定一孔加 200μL 蒸馏水, 计算时其它各孔 OD 值均需减去蒸馏水孔 OD 值后方可代入计算公式计算), 550nm 处酶标仪读数)

[注]: a*值为经过最佳取样量摸索实验后确定的取样量。

五、植物组织中 SOD 活力计算:

1、单位定义: 每克植物组织在本反应体系中 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:

$$\begin{aligned} \text{T-SOD活力 (U/g组织)} &= \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{总SOD测定}}}{A_{\text{对照}}} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{提}}} \\ \text{CuZn-SOD活力 (U/g组织)} &= \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{CuZn-SOD测定}}}{A_{\text{对照}}} \div 50\% \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{提}}} \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, (3.3+a)mL;

$V_{\text{样}}$: 取样量, (a)mL;

N : 样本前处理稀释倍数, 总SOD为 3, CuZn-SOD为 2;

W : 样本重量, g;

$V_{\text{提}}$: 匀浆时加入的匀浆介质的总体积, mL。

3、计算举例:

准确称取白菜叶片 0.25g, 加入匀浆介质 1mL, 剪碎, 冰水浴条件下机械匀浆, 制备成 20%的匀浆液, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取得的上清液, 再用匀浆介质 4 倍稀释成 5%的浓度, 分成两份, 分别用于T-SOD与CuZn-SOD测定, 按样本前处理要求分别对两份匀浆液进行处理, 先取稀释后的T-SOD待测液 0.01mL、0.03mL、0.05mL 进行最佳取样量摸索实验, 实验结果表明, 当加样量为 0.05mL (即

最佳取样量 a) 时, 抑制率为 43.3%, 则分别取 T-SOD 与 CuZn-SOD 各 0.05mL, 再按照操作表进行检测, 测得 T-SOD 测定管吸光度值为 0.274, CuZn-SOD 测定管吸光度值为 0.253, 对照管吸光度值为 0.482, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{T-SOD活力 (U/g组织)} &= \frac{0.482 - 0.274}{0.482} \div 50\% \times \frac{3.35}{0.05} \times 3 \div \frac{1}{4 \times 4} \\ &= 2775.63 \text{ U/g组织} \\ \text{CuZn-SOD活力 (U/g组织)} &= \frac{0.482 - 0.253}{0.482} \div 50\% \times \frac{3.35}{0.05} \times 2 \div \frac{1}{4 \times 4} \\ &= 2037.24 \text{ U/g组织} \end{aligned}$$