

植物铜锌-超氧化物歧化酶(Cu²⁺Zn²⁺-SOD)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A001-4-1 比色法 100管/48样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

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(O₂⁻), 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、试剂及耗材:

可调 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板), 涡旋混匀器, 普通低速离心机, 水浴锅, 冰乙酸 (分析纯级, 乙酸浓度≥99.5%), 双蒸水, 一次性塑料试管 (或离心管)、电炉 (配试剂加热用)。

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 倍体积的匀浆介质, 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

吸取 20% 匀浆上清液 0.1mL, 加入匀浆介质 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。

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, 比色			

[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 量为一个活力单位 (U)。

2、计算公式:

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



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

V_{反总}: 反应体系总体积, (3.3+a)mL;

V_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_提: 匀浆时加入的匀浆介质的总体积, mL。