

植物铜锌-超氧化物歧化酶(Cu²⁺-Zn²⁺-SOD)测定试剂盒

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 ($O_2^{\cdot-}$), 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:

试剂编号	试剂名称	装量规格	保存条件
试剂一	缓冲贮备液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
		(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: 用时每瓶加双蒸水稀释至 100ml, 4℃保存 1 年		
试剂二	底物液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
试剂三	基质液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
试剂四	酶贮备液	350 μl×2 支	-20℃保存
	酶稀释液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
	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。配好的酶应用液 4℃保存。		

试剂五	粉剂×1 支		4℃保存 1 年
	试剂六的配制：用时加双蒸水 75ml 溶解后备用，配好后 4℃冷藏避光保存 6 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℃避光冷藏 3 个月。[注]：冰乙酸，分析纯级，乙酸浓度≥99.5%		
试剂七	CuZn-SOD 提取甲液	12ml×1 瓶	4℃避光密封保存 1 年
	CuZn-SOD 提取乙液	12ml×1 瓶	4℃避光密封保存 1 年
试剂八	匀浆介质	60ml×2 瓶	4℃避光保存 1 年

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、T-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 10 μl、30 μl、50 μl 按操作表进行预试验，以确定最佳取样量。

$$\text{对照 OD 值} - \text{总 SOD 测定 OD 值} \times 100\%$$

百分抑制率计算公式：抑制率（%）=对照 OD 值

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 浓度一致的匀浆上清（即 20%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^*		
TSOD 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]：* 表示 a 值为经过最佳取样量摸索实验后确定的取样量。